



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

Ano 2017

**Valentina Alexandra
Francisco Alves
Pinheiro**

**Avaliação de alterações físico-químicas das
algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* sujeitas a
diferentes tratamentos de conservação**

**Evaluation of physical-chemical changes of the
macroalgae *Gracilaria sp.* and *Ulva rigida*
subjected to different conservation treatments**



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

Ano 2017

**Valentina Alexandra
Francisco Alves
Pinheiro**

**Avaliação de alterações físico-químicas das
algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* sujeitas a
diferentes tratamentos de conservação**

**Evaluation of physical-chemical changes of the
macroalgae *Gracilaria sp.* and *Ulva rigida*
subjected to different conservation treatments**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana M. Cardoso, Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor Artur M.S. Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA e ao grupo ReSyNa pela FCT, União Europeia, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE)

Projeto de investigação e desenvolvimento tecnológico em co-promoção POCI-01-0247-FEDER-003419, SHARP - Seaweed for Healthier Traditional Products, co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Temático Competitividade e Internacionalização, no âmbito do Programa "Portugal 2020".



o júri

presidente

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira
Wessel**

Professora Adjunta do Departamento de Indústrias Alimentares
da Escola Superior Agrária de Viseu

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química
da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Doutora Susana Cardoso e Professor Doutor Artur Silva pela orientação e apoio oferecido durante este ano.

A todo o grupo SHARP e colegas de laboratório pela instrução, ajuda e companheirismo que tornou a elaboração deste trabalho mais acessível e agradável.

À equipa da AlgaPlus pela assistência prestada.

E aos meus amigos e família pela paciência e amparo demonstrado mesmo nos momentos mais difíceis.

Palavras-Chave *Gracilaria sp.*, *Ulva rigida*, Desidratação, Salga, Salmoura, Embalamento, Armazenamento, Valores nutricionais, Cor superficial, Pigmentos, Textura.

Resumo A alga verde *Ulva rigida* e a alga vermelha *Gracilaria sp.* são algas edíveis e constituem uma fonte rica de nutrientes. No entanto, devido à sua elevada humidade, são um alimento muito perecível e por isso muitas vezes sujeitas a processamentos como forma de aumentar o seu tempo de prateleira. Neste contexto, este trabalho pretendeu avaliar o impacto de processamento de secagem a 25 °C, salmoura e salga (28 e 40%) nas alterações físico-químicas de *U. rigida* e *G. sp.*, considerando o seu tempo de armazenamento. Mais especificamente, as alterações de textura e/ou cor superficial foram registadas logo após o tratamento (t0), aos 30, 60, 120 e 180 dias, no caso da *U. rigida*, ou 30 e 60 dias, para a alga *G. sp.* Em adição, os parâmetros químicos (cinza, gordura, ácidos gordos, proteína, fibra dietética e pigmentos) foram determinados em t0 e no final do ensaio experimental (t180 e t60 para *U. rigida* e *G. sp.*, respetivamente).

Relativamente à cor superficial da *U. rigida*, foi possível verificar que ao longo dos 180 dias, a alga perdeu a sua tonalidade verde e intensificou o tom de amarelo e a sua luminosidade, em todas as condições de conservação. A fraturabilidade desta macroalga em t0 era superior quando sujeita a desidratação (2,44 N), em relação às algas com tratamento salino (1,3-2,1N) e, este parâmetro também sofreu um aumento significativo ao longo do tempo de armazenamento, em todas as amostras de *U. rigida*. Em relação aos parâmetros químicos, os resultados obtidos indicaram valores de % relativa de humidade de 14-15% b.s. em *U. rigida* desidratada e valores na gama de 60-70% b.s. para as algas sujeitas a tratamento salino. A % de cinza de *U. rigida* foi superior nas algas sujeitas a salga (atingindo valores de 21,1% b.s. na alga em salga 40%), diminuindo no entanto ao longo dos 180 dias. A fração lipídica recuperada da *U. rigida* desidratada (1,19% b.s.) em t0 foi consideravelmente superior à das outras condições de tratamento, tendo no entanto diminuído significativamente em t180. A redução de rendimento de extrato lipídico em t180 relativamente a t0 foi igualmente observado para as algas em salmoura, mas um comportamento oposto foi registado nas algas sujeitas a salga seca, cuja fração lipídica representava 0,49% b.s. e 0,41% b.s. em t0 e 0,65% b.s. e 0,54% b.s. em t180 (salga 28% e 40%, respetivamente). No geral, a concentração de ácidos gordos seguiu uma tendência semelhante à da recuperação da fração lipídica, permitindo sugerir que parte das diferenças neste último parâmetro poderão ser devidas a alteração de concentração dos níveis de ácidos gordos. Por outro lado, os níveis proteicos em *U. rigida* mantiveram-se constantes ao longo do tempo e entre condições de conservação, apresentando valores de 24-25% b.s. Já a % de fibra de *U. rigida* variou entre 40 e 60% b.s., manifestando maior % de fibra insolúvel que fibra solúvel aos 0 dias. Os pigmentos identificados em *U. rigida* foram as clorofilas (*a* e *b*) e feofitina *a*, que atingiram valores de aproximadamente 4 µg/mg b.s., e carotenoides (aprox. 0,7 µg/mg b.s.). Variações nos níveis destes pigmentos durante o tempo de armazenamento foram principalmente registados nas algas tratadas com salga seca.

A cor superficial da *G. sp.* apresentou diminuição dos tons vermelho, amarelo e também da sua luminosidade, excetuando a alga em salmoura que contrariou estas tendências. Em relação aos parâmetros químicos, os resultados obtidos indicaram valores de % relativa de humidade de 7-9% b.s. para a alga desidratada e valores na gama de 60-70% b.s. para as algas sujeitas a tratamento salino. A % de cinza de *G. sp.* atingiu valores de 26,6% b.s. em salga 28%, tendo-se verificado uma diminuição significativa de cinza nas salgas secas. A % de proteína manteve-se constante ao longo do tempo e entre condições de conservação em *G. sp.*,

apresentando valores de aproximadamente 25%. Em *G. sp.* apenas clorofila *a* e feorbidina *a* (1,2-0,2 µg/mg b.s.) foram identificados.

Keywords *Gracilaria sp.*, *Ulva rigida*, Dehydration, Salting, Brining, Packaging, Storage, Nutritional Values, Superficial Color, Pigments, Texture.

Abstract The green seaweed *Ulva rigida* and the red seaweed *Gracilaria sp.* are edible algae and constitute a rich source of nutrients. However, due to their high humidity, they are a very perishable food and therefore often subjected to processing, in order to increase their shelf life. In this context, the objective of this work was to evaluate the impact of the drying treatment at 25°C, brining and salting (28 and 40%) on the physical-chemical characteristics of *U. rigida* and *G. sp.*, considering its storage time. More specifically, changes in texture and/or surface color were recorded right after the application of the processing treatment (t0), or after 30, 60, 120 and 180 days in the case of *U. rigida*, or 30 and 60, for *G. sp.* In addition, the chemical parameters (ash, fat, fatty acids, protein, dietary fiber and pigments) were determined at t0 and at the end of the experimental assay (t180 and t60 for *U. rigida* and *G. sp.*, respectively).

Regarding the surface color of *U. rigida*, it was possible to verify that during the 180 days, the algae lost its green tone, while the yellow tone and luminosity were intensified, under all conditions of conservation. The fracturability of this macroalgae at t0 was higher when subjected to dehydration (2.44 N), in comparison to saline-treated algae (1.3-2.1 N), and this parameter also increased significantly over the storage time, in all *U. rigida* samples. Regarding the chemical parameters, moisture values for dehydrated *U. rigida* were 14-15% d.w., while those of saline-treated algae ranged in between 60-70% d.w.. The ash content of *U. rigida* was higher in the salting-treated algae (reaching values of 21.1% d.w. in the algae in 40% salting), decreasing, however, along the 180 days. The lipid fraction recovered from dehydrated *U. rigida* (1.19% d.w.) at t0 was considerably higher than those of the remaining treatments. However, this yield was significantly decreased in t180. The decrement in the yield of lipid extract at t180 relative to t0 was also observed for brined algae, but an opposite behavior was registered for dry-salting treated algae, whose lipid fraction represented 0.49% d.w. and 0.41% d.w. in t0 and 0.65% d.w. and 0.54% d.w. in t180 (salting 28% and 40%, respectively). In general, the fatty acid concentration followed a similar trend to that of the recovery of the lipid fraction, suggesting that part of the differences in the latter parameter are due to changes in the fatty acid levels. On the other hand, protein content in *U. rigida* remained constant over time and between storage conditions, presenting values of 24-25% d.w. The % of *U. rigida* fiber varied between 40 and 60% d.w., showing a higher percentage of insoluble fiber than soluble fiber at 0 days. The pigments identified in *U. rigida* comprised chlorophylls (*a* and *b*) and pheophytin *a*, which reached values of approximately 4 µg/mg d.w., and carotenoids (approximately 0.7 µg/mg d.w.). Variations in the levels of these pigments during storage time were mainly recorded dry salting algae.

The surface color for *G. sp.* showed a decrease of its red and yellow tones and well as of its luminosity, excepting for the treated-brined seaweeds that contradicted these tendencies. Regarding the chemical parameters, moisture values of 7-9% d.w. were registered for dehydrated algae, while those of saline-treated algae were in the range of 60-70% d.w. The ash % of *G. sp.* reached values of 26.6% d.w. in salting 28% condition, and there was a significant decrease of ash in dry salting. The % of protein was maintained over time and between storage conditions in *G. sp.*, presenting values of approximately 25% d.w. In *G. sp.* only chlorophyll *a* and feorbidin *a* (1.2-0.2 µg/mg d.w.) were identified.

Índice

<i>Lista de Abreviaturas</i>	iv
<i>Lista de Figuras</i>	vi
<i>Lista de Tabelas</i>	viii
1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. Algas</i>	1
<i>1.2. Valores Nutricionais</i>	2
<i>1.3. Algas Verdes</i>	5
<i>1.3.1. Ulva rigida</i>	6
<i>1.4. Algas vermelhas</i>	7
<i>1.4.1. Gracilaria sp.</i>	9
<i>1.5. Conservação dos alimentos</i>	10
<i>1.5.1. Desidratação</i>	11
<i>1.5.2. Adição de Sal ou Salga</i>	11
<i>1.6. Embalamento</i>	12
<i>1.6.1. Polietileno</i>	13
<i>1.6.2. Poliestireno</i>	15
<i>1.6.3. Papel Kraft</i>	15
<i>1.6.4. Legislação</i>	16
<i>1.7. Armazenamento</i>	18
<i>1.7.1. Efeitos do processamento e armazenamento nas propriedades nutricionais e tempos de prateleira dos alimentos</i>	18
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
<i>3.1. Recolha e preparação das amostras</i>	21
<i>3.2. Análises de parâmetros físicos das macroalgas</i>	22
<i>3.2.1. Análise de cor superficial</i>	22
<i>3.2.2. Análise de textura</i>	24
<i>3.3. Análises de parâmetros químicos das macroalgas</i>	24
<i>3.3.1. Teor de humidade relativa</i>	24
<i>3.3.2. Teor de cinzas</i>	24

3.3.3. Teor de gordura total.....	24
3.3.4. Quantificação e caracterização de ácidos gordos	25
3.3.5. Teor de proteína.....	27
3.3.6. Teor de fibra dietética.....	27
3.3.7. Quantificação e identificação de pigmentos	28
3.4. Tratamento estatístico	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Alterações físico-químicas na <i>Ulva rigida</i> por processamento e ao longo de tempo de armazenamento	31
4.1.1. Análise de parâmetros físicos.....	31
4.1.1.1 Análise de cor superficial	31
4.1.1.2. Análise de textura.....	36
4.1.2. Análise aos parâmetros químicos	37
4.1.2.1. Teor de humidade relativa.....	37
4.1.2.2. Teor de cinzas.....	38
4.1.2.3. Teor de gordura total	39
4.1.2.4. Quantificação e caracterização de ácidos gordos	40
4.1.2.5. Teor de proteína	43
4.1.2.6 Teor de fibra dietética	44
4.1.2.7. Quantificação e identificação de pigmentos.....	45
4.2. Alterações físico-químicas na <i>Gracilaria sp</i> por processamento e ao longo de tempo de armazenamento	49
4.2.1. Análise aos parâmetros físicos	49
4.2.1.1. Análise de cor superficial	49
4.2.2. Análises de parâmetros químicos.....	52
4.2.2.1. Teor de humidade relativa.....	52
4.2.2.2. Teor de cinzas.....	53
4.2.2.3. Teor de proteína	55
4.2.2.4. Quantificação e identificação de pigmentos.....	56
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. ANEXOS.....	a

7.1. Anexo I.....	a
--------------------------	----------

Lista de Abreviaturas

Ác. – Ácido

A.C. – Antes de Cristo

ADN – Ácido desoxiribonucleico

ANOVA – Análise de variância

a_w – Atividade da água

BHT – 2,6-Di-terc-butil-4-metil fenol

BSTFA – *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

C – Carbono

CE – Comissão Europeia

CFR – *Council on Foreign Relations*

CIE La*b* - Espaço de cor La*b*

D – Desidratada

E.U.A. – Estados Unidos da América

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA – *Food and Drug Administration*

G. sp. – *Gracilaria* espécie não identificada

GC-MS – *Gas chromatography–mass spectrometry*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HSV – Herpes

IE – Índice de escurecimento

IMTA – Aquacultura multitrófica integrada

LME – Limites de migração específica

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

MES-TRIS – Tampão de ácido 2-(*N*-morfolino)ethanosulfônico – tris(hidroximetil)aminometano

N – Azoto

n.a. – Não aplicável

PE – Poliestireno

PEAD – Polietileno de alta densidade

PEBD – Polietileno de baixa densidade

PVC – Policloreto de vinilo

S – Salga

SM – Salmoura

TMSCI – Cloreto de trimetilsililo

U. – *Ulva*

UV – Ultravioleta

v/v – volume/volume

Lista de Figuras

Figura 1. *Ulva rigida*.

Figura 2. *Gracilaria sp.*

Figura 3A. Estrutura química do polietileno de alta densidade.

Figura 3B. Estrutura química do polietileno de baixa densidade.

Figura 4. Estrutura química do poliestireno.

Figura 5. Sacos em papel Kraft para alimentos.

Figura 6. Modelo tridimensional representativo do espaço de cor $L^*a^*b^*$.

Figura 7. Exemplo de aparato Soxhlet para extração lipídica.

Figura 8A. Variação do parâmetro a^* em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 8B. Variação do parâmetro b^* em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 8C. Variação do parâmetro L em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 9A. Variação do parâmetro croma em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 9B. Variação do índice de escurecimento em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 10. Variação da força (N) necessária para fraturar *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 11. Percentagem de cinza de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 12. Percentagem de gordura total de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 13. Percentagem de proteína de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 14. Percentagem de fibra de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Figura 15. Cromatograma representativo do extrato de acetona das macroalgas *Ulva rigida* desidratada, em salmoura, em salga 28% e em salga 40%.

Figura 16A. Concentração em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de clorofila *a* em *Ulva rigida* para quatro condições de conservação.

Figura 16B. Concentração em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de clorofila *b* em *Ulva rigida* para quatro condições de conservação.

Figura 16C. Concentração em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de carotenoides em *Ulva rigida* para quatro condições de conservação.

Figura 17A. Variação do parâmetro a^* em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 17B. Variação do parâmetro b^* em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 17C. Variação do parâmetro L em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 18A. Variação do parâmetro croma em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 18B. Variação do índice de escurecimento em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 19. Percentagem de cinza de *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 20. Percentagem de proteína de *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Figura 21. Cromatograma representativo do extrato de acetona das macroalgas *Gracilaria sp.* desidratada, em salmoura, em salga 28% e em salga 40%.

Figura 22. Concentração em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de clorofila *a* em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química das macroalgas marinhas e as suas propriedades.

Tabela 2. Variação na composição química das algas verdes, vermelhas e castanhas.

Tabela 3. Composição química aproximada de *Ulva rigida*.

Tabela 4. Composição química aproximada de *Gracilaria sp.*

Tabela 5. Resumo das quantidades armazenadas e recolhidas para os diversos tratamentos de conservação. Dias de recolha das duas macroalgas.

Tabela 6. Comparação entre a diferença absoluta de cor (ΔE) em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Tabela 7. Percentagem de humidade relativa de *Ulva rigida* ao longo do tempo para quatro condições de conservação.

Tabela 8. Comparação entre a concentração de compostos lipídicos em mg/Kg de *Ulva rigida* seca ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Tabela 9. Dados de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ relativos aos pigmentos identificados no extrato de *Ulva rigida* para todas as condições de conservação.

Tabela 10. Comparação entre a diferença absoluta de cor (ΔE) em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

Tabela 11. Percentagem de humidade relativa de *Gracilaria sp.* ao longo do tempo para quatro condições de conservação.

Tabela 12. Dados de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ relativos aos pigmentos identificados no extrato de *Gracilaria sp* para todas as condições de preservação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas

As algas são organismos aquáticos, eucariotas e fotossintéticos que podem ser unicelulares (até 1 µm de diâmetro) ou pluricelulares (chegando aos 50 cm de comprimento), sendo as últimas designadas por macroalgas ou macrófitas. As macroalgas são abundantes e podem ser encontradas em quase todos os ecossistemas, embora no geral sejam mais abundantes e possuam maior diversidade em regiões marinhas temperadas¹⁻³.

As algas fornecem alimento, *habitat*, e proteção a diversas espécies. Vivem submersas e fixas a um substrato, podendo ser classificadas pela sua cor, estrutura e tipo de produtos que armazenam, variando muito na sua composição química e valor nutricional, sendo classificadas como vermelhas, verdes e castanhas de acordo com estas diferenças^{2,4,5}. A morfologia das macroalgas consiste normalmente de estruturas que se assemelham ao caule, folhas e raiz nas plantas, mas cujas designações são talo, lâminas e grampo, respetivamente. Devido a estas semelhanças e às suas propriedades fotossintéticas, alguns tipos de algas (como as vermelhas e as verdes) fazem parte do reino das plantas^{2,6}.

Tal como as plantas terrestres, as algas contêm várias substâncias orgânicas e inorgânicas que podem ser benéficas para o Homem. Atualmente, as algas são colhidas ou cultivadas numa escala industrial, existindo cerca de 246 espécies usadas para alimentação. Destas, 145 são usadas diretamente na alimentação, como é o caso da *Undaria pinnatifida* e *Palmaria palmata*, enquanto 101 espécies são essencialmente utilizadas para a extração de ficocolóides, como a *Gracilaria gracilis* e a *Pterocladia capillacea*⁷⁻⁹. Ao nível industrial e/ou comercial, as macroalgas são utilizadas em diversas formas, desde inteiras, ou na forma de farinha, flocos ou extratos. A sua utilização é vasta, nomeadamente na indústria alimentar, têxtil, biotecnológica e biomédica, onde são uteis como agentes gelificantes, estabilizantes, espessantes e emulsionantes de alguns produtos^{5,10}. Note-se ainda que por serem um alimento altamente rico em proteínas, lípidos, pigmentos, vitaminas e minerais, as algas são consideradas um recurso importante na aquacultura⁸.

1.2. Valores Nutricionais

Recentemente, as macroalgas têm sido usadas como um alimento com potenciais benefícios nutricionais na indústria alimentar e na medicina. São uma fonte de nutrientes (Tabelas 1) e agentes fitoquímicos, que incluem ficobiliproteínas, ácidos gordos, tocoferóis, carotenoides, vitaminas e outros, muitos deles com atividade biológica relevante, incluindo propriedades antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, entre outras. Assim, existe atualmente um interesse crescente em macroalgas para aplicação na saúde humana, principalmente como forma de prevenção de várias doenças^{11,12}. É no entanto importante realçar que a composição química e nutricional das macroalgas depende de vários fatores, com tanta diversidade e heterogeneidade entre espécies, e considerando as variações nas condições ambientais da cultura, desenvolvimento, recolha e processamento, os dados bibliográficos variam consideravelmente entre si^{4,13}. Análises nutricionais típicas em macroalgas identificam quantidades elevadas de nutrientes essenciais, por isso as macroalgas têm sido, em geral, criticadas favoravelmente como fontes de macro e micronutrientes^{14,15}.

Tabela 1. Composição química das macroalgas marinhas e as suas propriedades¹⁴⁻²⁰

Polissacarídeos e fibra dietética	A quantidade em peso seco de hidratos de carbono nas algas pode variar entre 4 e 76% (m/m) e a de fibra chega a 33-62% (m/m).
	Estão presentes em grandes quantidades, especialmente nas paredes celulares. São extraídos pela indústria de hidrocolóides: alginato de algas castanhas, carragena e agar de algas vermelhas.
	Polissacarídeos de armazenamento: laminarina nas algas castanhas, amido nas algas verdes e amido florídeo nas algas vermelhas.
	A maior parte destes polissacarídeos não são digeridos pelo sistema digestivo humano, pois as enzimas presentes não conseguem hidrolisar as macromoléculas nos monómeros que as constituem e, assim, podem ser considerados fibras dietéticas.
	Ulvana, o maior polissacarídeo solúvel em água, extraído de paredes celulares, representa cerca de 8-29% do peso seco de algas verdes.
Minerais	A fração mineral de algumas algas corresponde a aproximadamente 36% do peso seco total (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, etc.).

	<p>As algas castanhas são ricas em iodo. As <i>Laminariales</i> (<i>Phaeophyceae</i>) podem conter entre 1500 e 8000 ppm do peso seco total.</p> <p>Importantes fontes de cálcio. O conteúdo pode chegar a 7% do peso seco total nas macroalgas.</p>
Proteína e aminoácidos	<p>O teor de proteínas difere consoante a espécie, podendo alcançar 50% (m/m) nalgumas espécies.</p> <p>O conteúdo em proteínas das algas castanhas é geralmente mais baixo (5-15% do peso seco), enquanto as algas verdes e vermelhas apresentam valores mais elevados (10-30% do peso seco).</p> <p>Os ácidos aspártico e glutâmico constituem a maior fração de aminoácidos para a maior parte das algas marinhas.</p>
Lípidos e ácidos gordos	<p>Os lípidos representam apenas entre 1 e 5% do peso seco das algas, mas oferecem uma notável composição em ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), nomeadamente ácidos gordos ω-3 e ω-6.</p> <p>As algas marinhas contêm compostos lipídicos como carotenoides e terpenóides. Carotenoides são antioxidantes potentes. As algas castanhas são ricas em carotenoides, especialmente fucoxantina, β-caroteno e violaxantina; as algas vermelhas em β-caroteno, α-caroteno e os seus derivados di-hidroxilados: zeaxantina e luteína; a composição de carotenoides das algas verdes é semelhante ao das plantas superiores: β-caroteno, luteína, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina e neoxantina.</p> <p>Substâncias lipossolúveis com capacidades antioxidantes como o α-tocoferol, que está presente em maiores quantidades nas macroalgas que o β-, γ- e δ-tocoferol. Algas castanhas contêm mais α-tocoferol do que as verdes ou vermelhas.</p>
Vitaminas	<p>Fonte de vitaminas B, vitamina C (500-3000 mg/kg de massa seca nas algas verdes e castanhas, enquanto os níveis das algas vermelhas são 100-800 mg/kg) e vitamina E (as algas castanhas contêm os valores mais elevados).</p>
Polifenóis	<p>Os níveis mais elevados são encontrados nas algas castanhas, onde os florotaninos podem variar entre 5 e 15% de massa seca.</p>

As macroalgas são maioritariamente organismos clorofilados, o que não as torna necessariamente verdes, sendo divididas em 3 subgrupos segundo a sua composição e características químicas (Tabela 2): algas vermelhas, verdes e castanhas^{4,21}.

Tabela 2. Variação na composição química das algas verdes, vermelhas e castanhas^{1,20,22}.

Alga	Pigmentos fotossintéticos	Produtos de armazenamento	Paredes celulares
Vermelha	Ficobilinas (Ficoeritrina*, ficocianina, aloficocianina) Clorofila <i>a</i> e <i>d</i> Carotenoides (α -caroteno, β -caroteno) Xantofilas	Amido florídeo	Celulose Polissacarídeos sulfatados (alguns calcificados)
Verde	Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> β -caroteno e outros carotenos Xantofilas	Amido em grão	Celulose Glicoproteínas Ulvanas
Castanha	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> β -caroteno Fucoxantina e outras xantofilas	Crisolaminarina Florotaninos Iodo	Alginatos

1.3. Algas Verdes

Evidências ultraestruturais, bioquímicas e moleculares sugerem que estas algas podem ser subdivididas em 11 classes, mais concretamente em *Prasinophyceae*, *Chlorophyceae*, *Ulvophyceae*, *Cladophorophyceae*, *Bryopsidophyceae*, *Dasycladophyceae*, *Trentepohliophyceae*, *Pleurastrorphyceae*, *Klebsormidiophyceae*, *Zygnematophyceae*, *Charophyceae*. O filo *Chlorophytae* contém cerca de 500 géneros e aproximadamente 8000 espécies^{1,22}.

Tal como referido anteriormente, as *Chlorophytae* caracterizam-se pela sua cor verde, resultante da grande abundância das clorofilas *a*, *b*²¹, que não são mascaradas por outros pigmentos acessórios. No entanto, estas possuem também uma diversidade de carotenoides, entre os quais o β -caroteno e as xantofilas luteína, violaxantina, neoxantina, anteraxantina e zeaxantina. A sua composição polissacarídica inclui o amido em grão, que é armazenado dentro de cloroplastos, a celulose e algumas glicoproteínas, que compõem a estrutura das paredes celulares das algas verdes, as ulvanas, polissacarídeos sulfatados apenas presentes nos géneros *Ulva* e *Enteromorpha*, e algumas frutanas. Por vezes é também possível encontrar lípidos em forma de glóbulos, armazenados dentro ou fora dos cloroplastos^{20,22}. As algas verdes são por norma as mais ricas em cálcio, enquanto o seu conteúdo em sódio e potássio é normalmente inferior ao das outras algas. Tal como as algas vermelhas, as algas verdes são ricas em proteína com valores variáveis entre 10 e 47%^{5,8}.

Em geral, as *Chlorophyta* são menos estudadas na área dos metabolitos secundários, porém também possuem compostos com atividade biológica importante. Como exemplo, Kuniyoshi *et al.* isolaram de *Cladophora fascicularis* um éter difenílico {2-(2',4'-dibromofenoxy)-4,6-dibromoanisol}, que era eficaz no tratamento de toxinas²³. Ainda, foi demonstrada a atividade citotóxica de uma ulvana isolada de *Ulva lactuca*²⁴, e do *isorawsonol* (um derivado de difenilmetano bromado) isolado de *Arrainvilla rawsonii*²⁵ e para *halimedatrial* (diterpeno trialdeído) obtido da *Halmida lamouroux*²⁶. Outros compostos isolados de algas verdes, como o *cycloeudesmol* (isolado de *Chondria oppositoclada*)²⁷ e *lyengaroside A* (isolado de *Codium Iyengarii*) são potenciais agentes antibacterianos²⁸, enquanto os metabolitos ascosalipirrolidinonas A e B (isoladas de *Ascochyta salicorniae*) exibem atividade antiplasmodial²⁹. Além destes, existem compostos como o *halitunal* (isolado de *Halimeda tuna*)

que possuem atividade antiviral e atuam contra o coronavírus murino³⁰, o cimobarbatol e o 4-isocimobarbatol (isolados de *Cymopolia barbat*) que apresentam atividade antimutagénica³¹ e as capisteronas A e B (isoladas de *Panicillus capitatus*), que possuem atividade antifúngica³². No entanto, até ao momento, as algas verdes são maioritariamente usadas para consumo humano devido ao seu elevado valor nutricional. Podem ser cozinhadas em sopas, consumidas cruas em saladas, como acompanhamento em *sashimi* ou até usadas para fazer chá^{33,34}.

1.3.1. *Ulva rigida*



Figura 1. *Ulva rigida*¹⁰⁰
alimentação humana e animal^{9,35}.

O género *Ulva* pertence à ordem das Ulvanas que, por sua vez fazem parte da classe *Ulvophyceae*¹. Dentro das várias espécies, a *Ulva rigida* (Figura 1), também designada por alface-do-Mar, é uma fonte de alimento importante em muitos países asiáticos, representando um recurso natural com potencial valor económico para uso na

A estrutura da *Ulva rigida* consiste em lâminas planas compostas por camadas celulares duplas, que podem atingir 1 metro de comprimento. Esta alga fixa-se aos substratos das águas costeiras através de rizóides ou ocorre como massa flutuante¹. Fatores físicos e químicos como a temperatura, a salinidade, a luz, o arejamento e a composição de nutrientes da água afetam bastante a sua taxa de crescimento e a sua composição bioquímica³⁶. Tal como outras espécies de algas, também a composição bioquímica de *Ulva rigida* pode variar ao longo do ano e conforme a localização. Mas, no geral, esta alga contém quantidades elevadas de proteína, hidratos de carbono e minerais (Tabela 3):

Tabela 3. Composição química aproximada da *Ulva rigida*^{35,37,38}

Compostos	Valores médios
Hidratos de Carbono ^a	426,0
Proteína ^a	6,1
Lípidos ^a	9,0
Açúcares Redutores ^a	106,0
Clorofila <i>a</i> ^b	55,8
Clorofila <i>b</i> ^b	26,1
Carotenoides ^b	17,5
Minerais ^a	286
Fibra Dietética ^a	119,0

a) expresso em g/kg; b) expresso em mg/m²..

1.4. Algas vermelhas

As algas vermelhas ou *Rhodophytae* são, em termos filogenéticos, organismos muito antigos, tendo várias peculiaridades na sua morfologia e modo de reprodução³⁹. São classificadas como plantas não vasculares do supergrupo *Primoplantae* e pertencem a um grupo de aproximadamente 6100 espécies com uma grande variedade de formas e tamanhos¹³.

As algas vermelhas podem ser encontradas em todas latitudes, existindo maior abundância em regiões equatoriais. Espécies de algas vermelhas com talos gigantes aparecem em zonas frias e temperadas, enquanto em mares tropicais estas algas são maioritariamente pequenas e filamentosas. As *Rhodophytae* têm uma maior capacidade de viver a grandes profundidades por comparação com outras algas e conseguem crescer até 200 metros de profundidade, uma característica estritamente relacionada com a presença dos pigmentos acessórios ficobilinas, mais particularmente a ficoeritrina⁴⁰. De facto, as *Rhodophytae* são um tipo específico de algas que se caracteriza, tal como o seu nome indica, pela cor avermelhada. Esta cor deve-se à presença destes pigmentos acessórios, as ficobilinas (*R*-ficoeritrina), que mascaram a clorofila e os carotenoides^{2,41}.

As algas vermelhas possuem uma composição polissacarídica única. Ao contrário de outras algas, as *Rhodophyta* não possuem amido nos seus cloroplastos, usando o amido florídeo

do citoplasma como reserva. A parede celular destas algas representa cerca de 65% (m/m) de massa seca, englobando três domínios: parede fibrilar, matriz amorfa e glicoproteínas. Estes domínios encontram-se estreitamente interligados, sendo o principal componente da parede fibrilar a celulose (em alguns casos pode ser substituída por polímeros que contêm D-manose ou D-xilose, em vez da habitual D-glucose). As glicoproteínas promovem o *crosslink* entre fibras polissacarídeas, enquanto a matriz amorfa é essencialmente constituída por galactanas sulfatadas, como carragenanas e agaranas (ficolóides)¹³. De entre as algas, as vermelhas possuem um conteúdo mineral que pode atingir valores de 23% (m/m seca), sendo em geral bastante ricas em ferro. As algas vermelhas são também as mais ricas em proteína, com valores máximos de aproximadamente 47% do seu peso seco^{5,34}.

Mesmo quando comparadas com outros tipos de algas, as *Rhodophytae* são consideradas fontes importantes de metabolitos biologicamente ativos¹². Algumas possuem uma grande quantidade de compostos com atividade citotóxica, como monoterpenos halogenados e polihalogenados, éteres cíclicos, triterpenos, monoterpenos cíclicos, entre outros⁴²⁻⁴⁴. Foram também isolados compostos com atividade antiviral a partir de algumas macroalgas vermelhas, como é o caso do sulfolípido KM043, que é um potente inibidor do ADN eucariótico e da transcriptase reversa tipo I do HIV-1⁴⁵, bem como o éter 2,3,6-tribromo-4,5-di-hidroxibenzil-metílico, que é ativo contra as três estirpes de HSV-1⁴⁶. Adicionalmente, foram isolados compostos com atividade anti-inflamatória (ex. ceratospongamida)⁴⁷, antimicrobiana (ex. elatol)⁴⁸, inseticida (ex. monoterpenos)⁴⁹, antimalárica (ex. sesquiterpeno *snyderol*), entre outros⁵⁰.

1.4.1. *Gracilaria sp.*



Figura 2. *Gracilaria sp.* ¹⁰¹

Gracilaria é um género de algas vermelhas muito conhecidas na indústria, pois são uma fonte importante de agar e agarose¹. A *G. sp.* (Figura 2) é usada como base de uma bebida não alcoólica e em alguns países é usada em saladas e é consumida há várias décadas no Havai e em alguns países asiáticos³⁴.

Estruturalmente, a *Gracilaria sp.* é formada por talos cilíndricos e eretos com uma textura cartilaginosa. Possui uma construção uniaxial, crescendo a partir de uma única célula apical, por vezes surgindo vários ramos diferentes na mesma alga e é frequentemente encontrada em grandes aglomerados em baías ou lagoas de pouca profundidade e turbidas. As condições ótimas de sobrevivência são temperaturas entre 20°C e 30°C e salinidade de cerca de 20%^{1,51}. A composição bioquímica de *G. sp.* varia ao longo do ano e conforme a localização, mas no geral contém quantidades elevadas de proteína e minerais, tal como se pode verificar na Tabela 4^{5,52}:

Tabela 4. Composição química aproximada de *Gracilaria sp.* ^{38,52,53}

Compostos	Valores médios
Hidratos de Carbono ^a	7,70
Proteína ^a	47,40
Lípidos ^a	1,60
Açúcares Redutores ^b	0,16
Clorofila <i>a</i> ^{b,d}	0,73
Carotenoides ^{c,d}	15,67
Minerais ^a	25,90
Fibra dietética ^a	25,70

a) expresso em %(m/m); b) expresso em mg/g; c) expresso em µg/g; d) Valores referentes apenas à *G. verrucosa*

1.5. Conservação dos alimentos

Em 2011 a FAO estimou que quase um terço de todos os alimentos ficam deteriorados antes de serem consumidos, representando uma enorme perda, principalmente quando se tem em consideração que quase um milhão de pessoas passa fome. Para além disso, esta condição representa desperdício de mão-de-obra, água, energia, terreno e outros serviços necessários à produção de alimentos. Neste cenário, países pouco desenvolvidos dependem de métodos de embalagem rudimentares e perdem cerca de 70% dos alimentos por deterioração, ao contrário dos E.U.A que perdem apenas 15%^{54,55}.

Dentro do contexto acima exposto, os processos de conservação contribuem para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, otimizando a disponibilidade de nutrientes e a qualidade do alimento, reduzindo as perdas. Ao longo dos anos, vários processos de conservação de alimentos foram desenvolvidos para aumentar o tempo de prateleira e inibir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos^{56,57}.

No global, as variadas técnicas de conservação podem ser classificadas como tratamento térmico e tratamento não-térmico. Os tratamentos térmicos são considerados importantes pelos efeitos de conservação de alimentos através da destruição de enzimas e microrganismos. No entanto, também alteram ou destroem componentes dos alimentos que são responsáveis pela cor, textura e sabor. Alguns dos processos considerados tratamentos térmicos são o branqueamento, a pasteurização, a esterilização e a desidratação^{57,58}. Por outro lado, os tratamentos não térmicos são de vários tipos e incluem tratamentos a frio, com aditivos, por fermentação, irradiação e adição de açúcar ou sal⁵⁹. A maior parte destes métodos de conservação têm como base a diminuição da disponibilidade da água para atividade microbiana, atividade enzimática ou atividade química, determinando o tempo de prateleira de um alimento, sendo esta alteração medida pela atividade da água (a_w)⁵⁸. Os processos de conservação acima mencionados são os mais comumente aplicados na indústria alimentar, no entanto, é de esperar nos próximos anos um aumento da aplicação de técnicas emergentes como a de alta pressão, plasma a frio, ultrassons, etc.⁵⁶. Neste trabalho, utilizaram-se como processos de conservação a desidratação e a adição de sal.

1.5.1. Desidratação

A desidratação é a aplicação de calor em condições controladas de modo a remover a maioria da água presente no alimento por evaporação⁶⁰. A redução da massa e volume dos alimentos reduz custos de transporte e armazenamento. Para alguns tipos de alimentos, a desidratação fornece um produto conveniente para o consumidor ou um ingrediente mais facilmente manuseável por processadores de alimentos. No entanto, a secagem de alimentos pode causar a deterioração da qualidade e valor nutricional do alimento, dependendo das condições específicas aplicadas⁵⁸.

A desidratação pode ser executada recorrendo a vários métodos, como a secagem por ar quente, ou superfícies aquecidas, a desidratação por energia radiante, eletromagnética ou por liofilização. A secagem por ar quente funciona por convecção, em que o alimento entra em contacto com uma corrente de ar quente, enquanto o uso de superfícies aquecidas funciona por transmissão de calor ao alimento principalmente por condução. Apesar de todos os métodos de desidratação disponíveis, a secagem por ar quente é o mais utilizado na indústria, pelo seu custo reduzido e conveniência^{58,61}.

O principal objetivo da desidratação é o aumento do tempo de prateleira dos alimentos através da redução da atividade da água. A desidratação inibe o crescimento microbiano e a atividade enzimática, mas a temperatura de processamento é, normalmente, insuficiente para causar inativação. Portanto, qualquer aumento na humidade durante o armazenamento, devido a embalagem insuficiente ou defeituoso, pode resultar em deterioração mais rápida. O movimento do vapor de água de um alimento para o ar depende do alimento (quantidade de água e composição) e das condições do ar (temperatura e humidade)⁵⁸.

1.5.2. Adição de Sal ou Salga

O uso cloreto de sódio (designado vulgarmente como sal de cozinha) como aditivo é uma das técnicas de preservação de alimentos mais antigas. O sal cozinha e as soluções salinas são aditivos que penetram no interior do tecido dos alimentos provocando a saída de água e a diminuição da sua atividade, sendo um exemplo de desidratação por osmose. Com a incorporação de sal de cozinha no alimento, a solução externa torna-se hipertónica, obrigando a água a mover-se do interior das células para o seu exterior, provocando plasmólise e

consequente destruição das células microbianas. Assim, o tempo de conservação deste alimento aumenta, gerando um efeito inibitório sobre microrganismos, sendo alguns alimentos salgados, como o bacalhau ou outros peixes, mantidos à temperatura ambiente. Após a dessalga dos alimentos, a atividade da água aumenta, sendo por isso, importante serem consumidos imediatamente.

A adição de sal da cozinha a um alimento pode ser efetuada por 3 processos, nomeadamente por salga seca, salga húmida (ou salmoura) e salga mista, sendo a escolha do processo a aplicar dependente de vários fatores, incluindo o tipo de matéria-prima, o objetivo do tratamento e os fatores económicos⁵⁹⁻⁶¹. Na salga seca, o sal de cozinha é depositado ou friccionado sobre a superfície do produto de forma homogénea em toda a extensão do produto. Para os casos mais comuns, a quantidade adicionada varia normalmente entre 20 e 30%, podendo em alguns casos ser uma percentagem maior. A penetração do sal depende da temperatura, que é ótima a 15°C, e do tamanho dos cristais^{59,61}. Na salga húmida, também designada de salmoura, o produto é colocado em tanques contendo solução salina concentrada (máximo 26,5% m/v ou 100° salómetros), de modo a este ficar imerso na mesma durante um curto período de tempo. A salga é influenciada por diversos fatores como o sal de cozinha (pureza, granulometria e microflora), a matéria-prima (índice de frescura, conteúdo de gordura e espessura da peça) e as condições climáticas (temperatura, humidade e ação conservadora do sal de cozinha)⁶¹.

1.6. Embalamento

As primeiras embalagens que se conhecem remontam ao primeiro século A.C., quando os Chineses começaram a embalar alimentos com casca de árvore tratada e outros precursores do papel. Também na guerra Franco-Austríaca de 1809, Napoleão Bonaparte alimentava as suas tropas com comida enlatada. Por outro lado, os plásticos só foram descobertos décadas depois e só começaram a ser utilizados em alimentos para uso público no século XX. De facto, o embalamento atual dos alimentos foi iniciado com a água e propagou-se a outros alimentos porque os mantêm secos e limpos, tornando-os mais fáceis de transportar, impedindo a contaminação por animais e insetos e protegendo-os de fatores ambientais prejudiciais como o ar, a humidade e a luz^{55,62}. Atualmente, quase todos os alimentos comprados são embalados e frequentemente as embalagens possuem várias camadas, de modo a estes chegarem em

segurança até ao consumidor. Alguns dos materiais mais comuns para este propósito são o papel, vidro, alumínio e plástico, cada um destes oferecendo diferentes vantagens e limitações⁶². Com as tendências globais e constante exigência dos consumidores a indústria de embalagens é compelida a desenvolver soluções que atendam a esta necessidade. Por isso, recentemente, o desenvolvimento de embalagens inteligentes capazes de monitorizar e controlar a qualidade e segurança do alimento têm sido muito importantes na indústria alimentar⁶³.

O plástico foi introduzido na fabricação de embalagens no pós-guerra (Segunda Guerra Mundial) e engloba, entre outros, filmes, sacos, tubos e frascos. Propriedades como baixa densidade, resistência a quebra, eliminação de arestas afiadas, fácil vedação, flexibilidade de fabrico e moldagem, durabilidade ambiental, impermeabilidade ao oxigénio e ao vapor de água, controlo da atmosfera de embalamento, proteção de odores, controlo da luz e aspeto da embalagem, facilidade de impressão, facilidade de revestimento, inércia de componentes, resistência a perfurações e rasgões e, flexibilidade a baixas temperaturas, tornam os plásticos ideais para embalamento de alimentos⁵⁵. De acordo com a substância iniciadora e o modo de produção, os plásticos podem ser diferenciados em vários tipos, incluindo os de polietileno de baixa e alta densidade, poliestireno, policloreto de vinilo (PVC), polipropileno, etc.^{55,64}.

Na maioria das aplicações alimentares, uma só camada protetora não é adequada para embalamento. Neste contexto, existem atualmente no mercado produtos de embalamento que combinam vários materiais (plástico, papel, etc.), até 15 camadas, a fim de otimizar a funcionalidade da embalagem e a proteção dos alimentos^{62,65}. Um sistema de embalamento muito versátil é o saco-na-caixa, que pode ser utilizado para produtos líquidos ou sólidos. Este sistema consiste num saco de plástico (por exemplo polietileno) ajustado de modo a ficar contido numa unidade de cartão, plástico, metal ou outro. A escolha do material determina ‘como’ e durante ‘quanto tempo’ o produto pode ser armazenado sem se deteriorar⁵⁵. Neste trabalho apenas foram utilizados como material de embalamento o polietileno de alta densidade, o poliestireno e o papel Kraft.

1.6.1. Polietileno

O polietileno e os co-polímeros de etileno são, atualmente, os plásticos mais utilizados para embalamento de alimentos, podendo ser divididos em 4 grupos: polietileno de baixa

densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), co-polímeros de etileno e polietileno linear de baixa densidade. O PEBD (Figura 3A) foi o primeiro destes quatro plásticos a ser produzido, sendo constituído por uma estrutura de cadeia longa de monómeros de etileno repetidos, unidos com orientação cabeça-cauda. Por outro lado, o PEAD (Figura 3B) surgiu pouco depois da comercialização do polietileno de baixa densidade, após descoberta da possibilidade de polimerização do etileno a pressões muito mais baixas, na presença de um catalisador para iniciar a polimerização. O polímero resultante possui uma densidade maior ($0,940 \text{ g/cm}^3$), muito pouca ramificação das cadeias e maior cristalinidade, resultando num plástico com maior resistência à tensão, mais rijo e com maior impermeabilidade aos gases, e simultaneamente menos límpido e menos resistente a impactos em comparação com o PEBD. Note-se que o PEAD é dos polímeros mais versáteis usados em embalagem, pois o seu aquecimento permite obter filmes deste plástico ou moldá-lo em formas de todos os tipos. Associando o seu baixo preço a estas características, o PEAD alcança um consumo anual bastante elevado, podendo ter aplicações desde garrafas a sacos de plástico⁵⁵. Este plástico é também o mais utilizado na AlgaPlus para embalar tanto as algas secas como as conservadas em salga e salmoura.

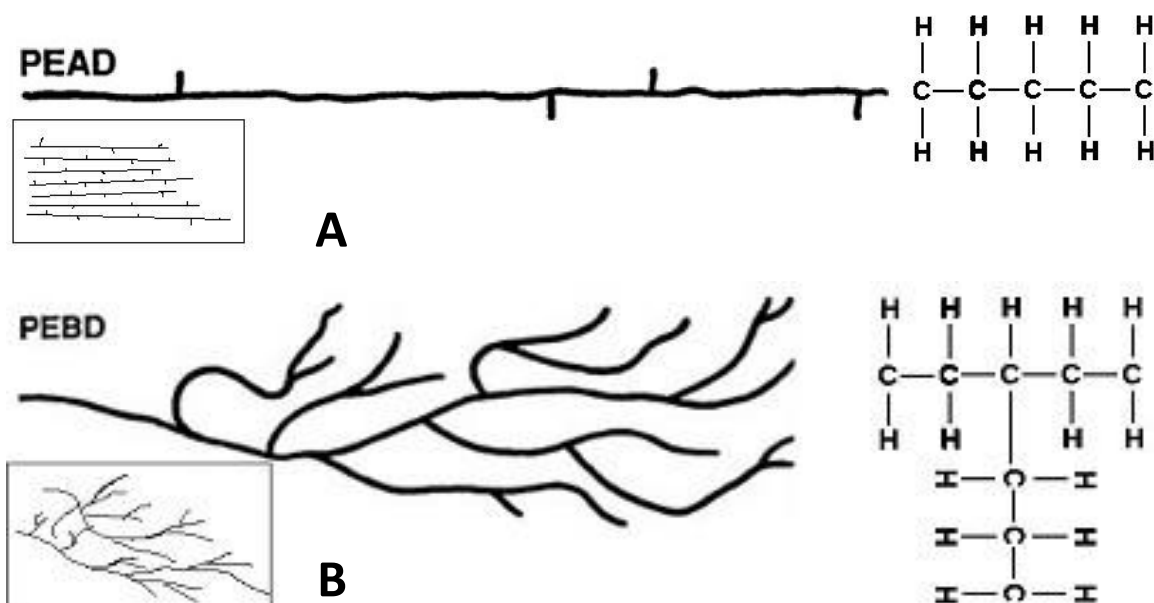


Figura 3. A) Estrutura química do polietileno de alta densidade
B) Estrutura química do polietileno de baixa densidade⁶⁶

1.6.2. Poliestireno

O poliestireno (PE) (estrutura representada na Figura 4) é um material amorfo, rijo, frágil e de baixa resistência, com um ponto de fusão relativamente baixo (88°C) e baixa resistência a impacto⁵⁵. Este polímero pode ser termoformado ou moldado por injeção, que é normalmente efetuado através de uma massa plástica catalisada por peróxido ou por polimerização de estireno através da dupla ligação no grupo etileno ligado ao anel benzênico. A sua polimerização é realizada a baixa pressão e temperaturas entre 120 e 200 °C⁵⁵.

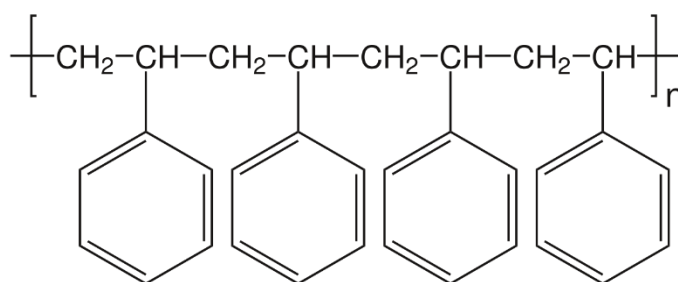


Figura 4. Estrutura química do poliestireno ⁶⁷.

Tal como em outros termoplásticos, a adição de agentes espumantes, como o *n*-hexano, à mistura reacional durante a polimerização do poliestireno dá origem a um “poliestireno expandido” (PE). Deve realçar-se que o PE tem uma densidade muito baixa, mas é um material rijo, que pode ser usado em embalagem alimentares como as caixas de ovos ou cuvettes de carne. Este material é muito vantajoso devido à sua alta rigidez, permitindo a produção de caixas duras apesar da sua baixa densidade e baixo custo. Quando utilizado como embalagem alimentar possui, no entanto, o problema de não funcionar como barreira para gases, sendo necessário uma utilização adicional de filmes que sirvam de barreira. A AlgaPlus utiliza este material para embalar as algas em salga e salmoura, sendo que o poliestireno expandido contém um saco de plástico PEAD no seu interior no qual se coloca as algas.

1.6.3. Papel Kraft

O papel Kraft (Figura 5) é um papel obtido por um processo químico alcalino de remoção de lenhina, conhecido por processamento por sulfato ou processamento Kraft. Mais

especificamente, o processo envolve o processamento da madeira com hidróxido de sódio e sulfureto de sódio a altas temperaturas durante um período curto de tempo, obtendo-se uma polpa que forma um papel mais forte do que o obtido por outros processos semelhantes. O papel Kraft é um papel do tipo grosseiro que é usado para embalagens, sendo espesso, forte e resistente mas maleável. A polpa é a matéria-prima para a produção de papel, é obtida de lenhina (que representa 26-30% do total das fibras da madeira) que necessita de ser removida de modo a se obter papel. A remoção da lenhina por processos químicos ou mecânicos é particularmente importante, pois afeta a força do papel. O papel Kraft é branqueado para utilização em embalagens alimentares pois, estas requerem maior força⁶⁸, sendo muitas vezes utilizado em conjunto com o PEAD, dando origem a um filme misto. Este último sistema de embalagem é utilizado como embalagem para algas desidratadas na AlgaPlus.



Figura 5. Sacos em papel Kraft para alimentos⁶⁹.

1.6.4. Legislação

A legislação em vigor para materiais em contacto com alimentos tem por objetivo garantir a proteção da saúde humana e os interesses dos consumidores. Todos os materiais ou objetos destinados a entrar em contacto direto ou indireto com os alimentos têm de ser produzidos seguindo os princípios de Boas Práticas de Fabrico. Além disso, não devem transferir substâncias em quantidades que possam provocar risco para a saúde humana, provocar

uma modificação na composição dos alimentos ou alterar as propriedades organoléticas dos alimentos, segundo o *Regulamento 1935/2004 de 27 de Outubro de 2004* e o *Regulamento 2023/2006 de 22 de Dezembro de 2006*^{70,71}. Note-se também que para qualquer embalagem alimentar é necessário a indicação de toda a informação relevante aos consumidores sobre os géneros alimentícios, estabelecendo princípios, requisitos e responsabilidades gerais que administram a informação geral e a nutricional. Deste modo, a rotulagem disponibiliza ao consumidor uma informação completa sobre o conteúdo e a composição dos produtos, e concordância com o *Regulamento (CE) n.º 1169/2011*⁷².

Em particular, as embalagens de plástico devem seguir o *Regulamento 10/2011* e as suas emendas que avaliam a migração dos materiais plásticos para os produtos alimentícios e que estabelecem, nomeadamente: a) a lista de substâncias autorizadas para o uso no fabrico de materiais e objetos (Lista da União de substâncias autorizadas); b) as restrições no uso das substâncias utilizadas no fabrico ou como matéria-prima das embalagens; os limites de migração global; os limites de migração específica (LME); e c) os simuladores adequados e as condições de ensaio e a declaração de conformidade. Realça-se que o parâmetro de migração global se refere à quantidade de substâncias que passam do material para o alimento, não identificando, no entanto, as substâncias. Os materiais e objetos de matéria plástica não devem ceder os seus constituintes aos simuladores alimentares em quantidades superiores a 10 miligramas de constituintes totais por dm^2 de área superficial em contacto com os alimentos (mg/dm^2). Estes ensaios podem ser realizados com vários simuladores, nomeadamente água destilada, ácido acético 3% (m/v), etanol a 10% ou outra % (v/v) adequada conforme o alimento, e óleo vegetal.

Adicionalmente, a migração específica refere-se à quantificação, no simulador do género alimentício, da substância utilizada no fabrico do material assegurando que o material em contacto com os alimentos não constitui um risco para saúde. Para esta quantificação é imprescindível saber quais as substâncias de fabrico. Em alguns casos é apresentada a quantidade máxima permitida de “resíduo”, em alternativa à especificação do limite de migração específica⁶⁵.

Por outro lado, as embalagens de papel utilizadas em alimentos, quer seja material simples ou com algum revestimento não é sujeita a legislação europeia específica, recorrendo-se a resoluções e documentos técnicos do Conselho da Europa; à administração de alimentos e

medicamentos dos Estados Unidos (FDA), (CFR) e à legislação específica de outros países⁷³. Realça-se também que embalagens de papel devem seguir o *Regulamento (CE) n° 1935/dependente 2004*, o *Regulamento (CE) n° 2023/2006* e o *Regulamento (CE) n° 1169/2011* referidos anteriormente^{72,74,75}.

1.7. Armazenamento

O tempo de prateleira de um alimento não é apenas dependente dos processos de conservação, sendo, também, necessário mantê-lo devidamente armazenado. De facto, a correta manipulação de alimentos, ingredientes e embalagens desde o processo de produção até ao consumidor são fatores essenciais para otimizar a qualidade do produto e minimizar custos. As condições físicas de armazenamento são um aspeto importante, pelo que qualquer descuido pode resultar em contaminações e perdas. As principais razões para deterioração de alimentos são pragas, microrganismos, poeiras e resíduos externos, atividade respiratória dos alimentos, atividade enzimática, derramamentos, rutura de embalagens e condições de armazenamento incorretas. Portanto, o armazenamento correto e prevenção da deterioração é particularmente importante para produtos acabados⁵⁸.

Para armazenamento à temperatura ambiente, o espaço deve ser fresco e com boa ventilação. No entanto, o armazenamento de certos produtos deve ser efetuado em condições de refrigeração, reduzindo a temperatura dos alimentos para temperaturas entre os -1 e 8°C. A refrigeração é utilizada para diminuir a velocidade das reações bioquímicas e microbiológicas e aumentar o tempo de prateleira de alimentos frescos e processados. Este processo é normalmente utilizado em combinação com outros, como a pasteurização ou a salga (seca e húmida)^{58,76}.

1.7.1. Efeitos do processamento e armazenamento nas propriedades nutricionais e tempos de prateleira dos alimentos

Os métodos de processamento podem afetar o alimento de várias formas e, em alguns casos, este pode mesmo torna-se num produto diferente e irreversivelmente alterado. No global, a desidratação por ar quente ou adição de sal de cozinha alteram significativamente a atividade da água (a_w). Refira-se que a maioria das bactérias, fungos e leveduras são inibidos para a_w

abaixo de 0,91, 0,80 e de 0,88, respetivamente e, desta forma, em condições de a_w abaixo de 0.6 a maioria da atividade microbiana é inibida. Igualmente, abaixo de certos valores de a_w , a atividade enzimática praticamente cessa, devido à baixa mobilidade do substrato e à sua inabilidade em se ligar ao local ativo da enzima. Por outro lado, as alterações químicas como o acastanhamento de Maillard e a oxidação de lípidos são mais complexas e podem ocorrer para baixos valores de a_w , verificando-se que a taxa máxima de acastanhamento difere de alimento para alimento. Ainda, a taxa de oxidação diminui a a_w alta, pois os antioxidantes e agentes quelantes tornam-se solúveis e a atividade catalítica de metais é reduzida por hidratação. Além disto, o processamento por calor é uma grande causa de alterações nutricionais dos alimentos, destruindo vitaminas, reduzindo o valor biológico de proteínas e causando a oxidação lipídica. Naturalmente, a perda de nutrientes varia com o alimento, sendo também dependente do seu valor nutricional⁵⁸.

Todas estas alterações influenciam a qualidade do produto e as suas características sensoriais (textura, cor, aroma, sabor, forma) e, por consequência, a aprovação do consumidor. A textura dos alimentos é maioritariamente determinada pela humidade, conteúdos de gorduras e tipos e quantidades de hidratos de carbono estruturais. Alimentos frescos contêm misturas complexas de compostos voláteis que atribuem aromas e sabores característicos, sendo alguns detetáveis a concentrações muito baixas. Estes compostos voláteis podem ser perdidos durante o processamento, reduzindo a intensidade de alguns sabores, revelando outros compostos. Muitos pigmentos que ocorrem naturalmente nos alimentos são destruídos durante processamento por calor, sendo quimicamente alterados por alterações de pH ou oxidação durante o armazenamento. Como resultado, alguns alimentos processados perdem a sua cor e consequentemente o seu valor^{56,58}.

Apesar de tudo o que foi explicado acima, o processamento tem como principal objetivo aumentar o tempo de prateleira, não obstante, os alimentos não poderem ser consumidos durante tempo indefinido ficando, sem exceção, deteriorados com o tempo. Isto deve-se ao facto dos alimentos serem suscetíveis a invasão microbiana e às alterações químicas relacionadas. Assim, com a diminuição do valor nutricional e o aumento do teor microbiano os alimentos perdem qualidade sensorial, diminuindo a sua aceitabilidade pelo consumidor⁷⁷.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

A AlgaPlus é uma empresa que se dedica à produção e comercialização de macroalgas, usando vários métodos de conservação e embalagem para venda ao consumidor final⁷⁸. Neste trabalho pretendeu-se comparar as propriedades físico-químicas da macroalga verde *Ulva rigida* e da macroalga vermelha *Gracilaria sp.* quando sujeitas a diferentes tratamentos de conservação, bem como monitorizar possíveis efeitos nestes parâmetros durante o seu tempo de armazenamento. Em detalhe, *Ulva rigida* e *Gracilaria sp.* foram sujeitas a 4 condições de conservação: embalagem de alga desidratada em sacos multicamada (papel Kraft e PEAD), salmoura a 25% (m/v) com sal de cozinha, salga seca a 28% e 40% (m/m) e embalagem destas 3 condições em sacos de PEAD dentro de caixas de poliestireno. Ao longo do tempo avaliou-se para a macroalga *Ulva rigida* os parâmetros físicos e a humidade relativa aos 0, 30, 60, 120 e 180 dias e avaliou-se os restantes parâmetros químicos aos 0 e 180 dias. Também para a macroalga *Gracilaria sp.* avaliaram-se os parâmetros físicos e a humidade relativa aos 0, 30 e 60 dias e os restantes parâmetros químicos aos 0 e 60 dias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Recolha e preparação das amostras

As macroalgas *Ulva rigida* (lotes U1.4616.D, U1.4616.SM e U1.4616.S) e *Gracilaria sp.* (lotes G1.1217.D, G1.1217.SM e G1.1217.S) foram cultivadas num sistema de aquicultura multitrófica integrada (IMTA) localizado na Ria de Aveiro, pela empresa AlgaPlus, Lda. Todas as amostras foram colhidas à mão e imediatamente lavadas com água da Ria tratada com radiação UV. Os lotes U1.4616.D e G1.1217.D foram secos à temperatura de 25 °C durante 16 horas, e de seguida armazenados em sacos de multicamadas de papel Kraft e polietileno de alta densidade (3 sacos por cada lote de alga). Alternativamente, os lotes U1.4616.SM e G1.1217.SM foram submersos numa solução de 25% (m/v) de sal de cozinha e armazenados em caixas de poliestireno expandido cobertas com polietileno de alta densidade, enquanto os lotes U1.4616.S e G1.1217.S foram misturados com 28% ou 40% (m/m) de sal de cozinha e também armazenados em caixas de poliestireno expandido cobertas com polietileno de alta densidade (3 réplicas por cada tratamento) (Tabela 5) e mantidos no frio à temperatura de 3-4 °C. Ao longo do tempo foram recolhidas amostras das macroalgas e enviadas para o laboratório. Aquando da sua receção, as amostras foram lavadas com água destilada, congeladas, liofilizadas, moídas (moinho Yellowline A10 20000 rpm, IKA, Works Inc.) e passadas através de um crivo com um tamanho de partícula <0,25 mm.

Tabela 5. Resumo das quantidades armazenadas e recolhidas para os diversos tratamentos de conservação. Dias de recolha das duas macroalgas.

Alga		<i>Ulva rigida</i>					<i>Gracilaria sp.</i>		
Quantidade Inicial	Desidratada	3** x 0,5 kg					3** x 0,5 kg		
	Salmoura	3** x 4 kg					3** x 1 kg		
	Salga 28%								
	Salga 40%								
Quantidade por Recolha***	Desidratada	100 g					100 g		
	Salmoura	400 g					300g		
	Salga 28%								
	Salga 40%								
Recolha (tDias)*		t0	t30	t60	t120	t180	t0	t30	t60

*Tempos de recolha serão descritos ao longo do texto sob a forma tDias. ** Réplicas de amostra. ***Quantidades recolhidas para análise aos tDias.

3.2. Análises de parâmetros físicos das macroalgas

Estas análises foram realizadas em triplicado de amostra (Tabela 5) e para cada réplica de amostra realizou-se 6 réplicas de análise.

3.2.1. Análise de cor superficial

As macroalgas foram colocadas em água durante 15 minutos e de seguida foram estendidas sem dobras ou sobreposições (*Ulva rigida*) ou aglomeradas (*Gracilaria sp.*) e colocadas em papel absorvente para remoção do excesso de água. A cor superficial foi analisada com um colorímetro (CM 2300d, Konica Minolta, Japan) previamente calibrado com a cor branca padrão, tendo-se efetuado um mínimo de 6 registos em cada macroalga e exprimindo os resultados usando parâmetros CIE $L^* a^* b^*$, onde L representa a luminosidade, a^* a coordenada vermelho/verde e b^* a coordenada amarelo/azul, (Figura 6). Para calcular a diferença total de cor entre tempos de análise foi usada a equação (1) ⁷⁹:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

ΔL – Diferença entre o valor L^* registrado para alga aos 0 dias e o valor registrado para os restantes tempos de análise;

Δa – Diferença entre o valor a^* registrado para alga aos 0 dias e o valor registrado para os restantes tempos de análise;

Δb – Diferença entre o valor b^* registrado para alga aos 0 dias e o valor registrado para os restantes tempos de análise.

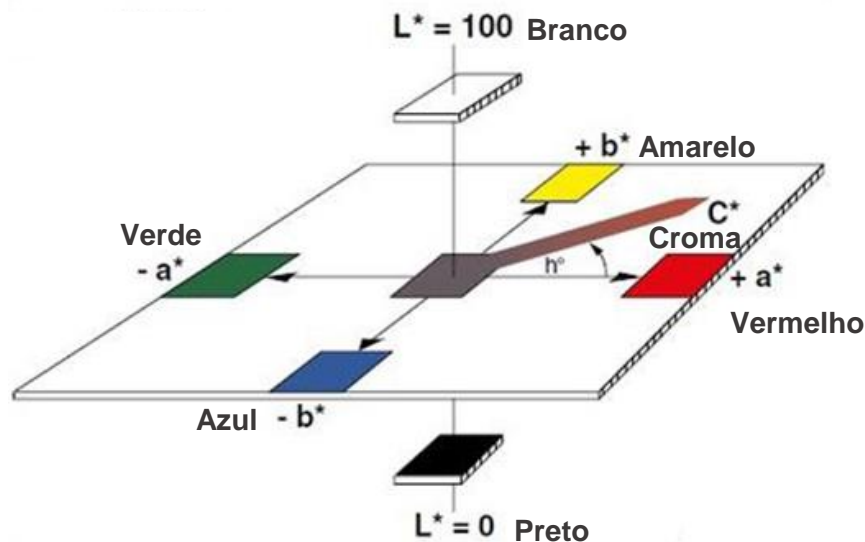


Figura 6. Modelo tridimensional representativo do espaço de cor $L^*a^*b^*$. Adaptado de Shanghai Kingland Fine Chemistry Co.,Ltd. (2017)⁸⁰.

O índice de acastanhamento foi calculado usando as coordenadas $L^*a^*b^*$ obtidas anteriormente, por utilização da equação 2⁸¹:

$$\text{Índice de escurecimento} = \frac{100 \times \left[\frac{(a^* + 1,75 \times L^*)}{(5,645 \times L^* + a^* - 3,02 \times b^*)} - 0,31 \right]}{0,172} \quad (2)$$

A saturação de cor (croma) foi determinada através das coordenadas a^* e b^* obtidas anteriormente, pela equação 3⁸²:

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

3.2.2. Análise de textura

A fraturabilidade das amostras foi avaliada usando um texturómetro TA-HDi (Stable Micro Systems), com uma célula de força 5 kg e uma sonda de perfuração de aço inoxidável de 6 mm. Para tal, a amostra de *Ulva rigida* hidratada foi estendida sem dobras ou sobreposições e colocada na plataforma de análise, tendo o pico da força necessária para perfurar a amostra sido registado pelo programa Texture Expert Exceed 2.64 e expresso em Newtons (N).

3.3. Análises de parâmetros químicos das macroalgas

Estas análises foram realizadas em triplicado de amostra.

3.3.1. Teor de humidade relativa

Colocou-se cerca de 2 g de amostra em cadinhos, previamente secos durante 2 horas a 105°C. Levou-se amostra à estufa a uma temperatura de 105°C durante a noite (cerca de 10-12 horas). Após o arrefecimento dos cadinhos em exsicador, efetuou-se a respetiva pesagem, permitindo calcular a percentagem (%) de humidade relativa da amostra pela equação 4:

$$\% \text{ Humidade Relativa} = \frac{\text{massa de água (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (4)$$

sendo, massa de água (g) = massa de amostra inicial (g) - massa seca (g).

3.3.2. Teor de cinzas

A amostra anteriormente utilizada para a determinação da humidade, foi levada à mufla (Select-Horn, JP Selecta) a uma temperatura de 550° C durante 6 horas. Após o arrefecimento dos cadinhos em exsicador, foi registada a massa do resíduo obtido e calculada a percentagem (%) de cinzas na amostra pela equação 5:

$$\% \text{ Cinza} = \frac{\text{massa Cinza (g)}}{\text{massa Seca (g)}} \times 100 \quad (5)$$

3.3.3. Teor de gordura total

Pesou-se aproximadamente 10 g de amostra para um cartuxo de papel de filtro que se colocou no *Soxhlet*. A montagem incluiu um balão de destilação com 250 mL de éter de petróleo

utilizado para extrair a gordura da amostra durante 8 horas (Figura 7). A solução com a gordura extraída foi filtrada através de filtros de *nylon* de porosidade 0,4 µm e de seguida levada à secura em evaporador rotativo a 40°C e seca em estufa a 105°C *overnight*. O teor de gordura total foi calculado utilizando a equação 6:

$$\% \text{ Gordura Total} = \frac{\text{massa do resíduo (g)}}{\text{massa de amostra (g)}} \times 100 \quad (6)$$

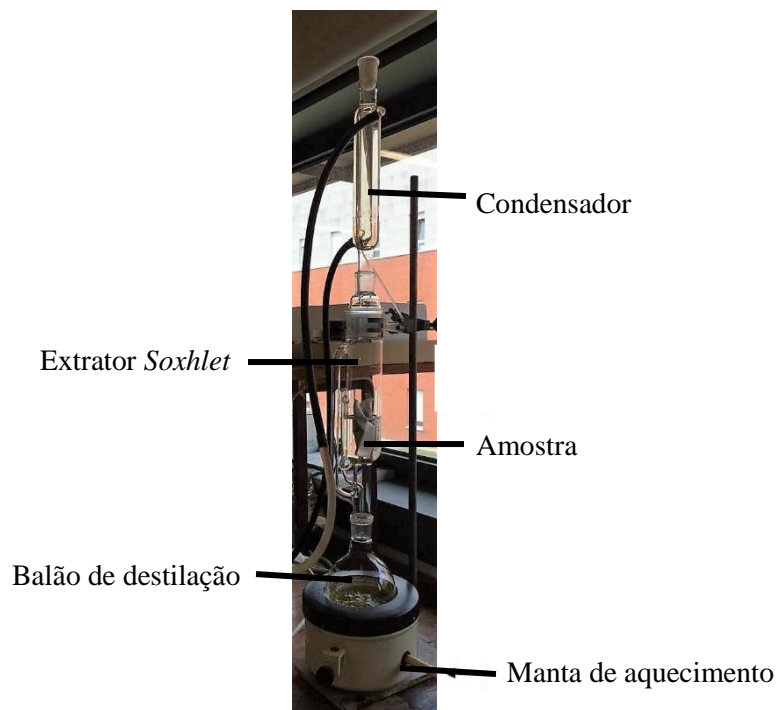


Figura 7. Exemplo de montagem *Soxhlet* para extração lipídica.

3.3.4. Quantificação e caracterização de ácidos gordos

A fração lipídica obtida em 3.3.3 foi dissolvida em 10 a 12 mL de n-hexano e armazenada em tubos com rosca a 20 °C, sob atmosfera de azoto até análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). As amostras foram previamente derivatizadas para conversão dos grupos hidroxilo e carboxilo dos lípidos em grupos derivados de trimetilsililo (TMS). Para tal, do extrato lipídico armazenado transferiu-se um volume previamente definido para tubos com rosca previamente pesados e removeu-se o solvente com uma corrente de azoto gasoso. Ao resíduo (aprox. 20 mg) adicionaram-se 250 µL de solução de padrão interno (1,5 mg/mL de tetracosano solubilizado em piridina), 250 µL de *N,O*-

bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL de cloreto de trimetilsililo (TMSCl). A sililação da mistura ocorreu durante 30 minutos a 70 °C, por fim esta foi transferida para *vials* para análise por GC-MS¹⁰².

A calibração foi efetuada com compostos de referência puros, representativos das maiores famílias lipofílicas. Para tal, as curvas de calibração de todos os padrões (pentadecanol, ácido palmítico e colesterol) foram preparadas na mesma solução e injetadas ao mesmo tempo. Pesou-se 50 mg de cada padrão e dissolveu-se completamente os três compostos em conjunto com solução de padrão interno, transferiu-se a solução resultante para um balão volumétrico de 5 mL e perfez-se o volume com solução de padrão interno. Prepararam-se 5 diluições (10, 8, 6, 4, 2 mg/mL) usando solução de padrão interno e repetiu-se o processo de sililação realizado para os extratos lipídicos, exceto a secagem¹⁰².

A análise cromatográfica foi executada por injeção das amostras derivatizadas no equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS), modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu) equipado com um auto-injetor AOC-20i e uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm diâmetro, 0,25 µm de espessura). O programa de eluição decorreu numa coluna capilar DB-1 J&W (30 m x 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) com hélio (35 cm/s). A eluição começou a 70°C durante 5 minutos seguido de um aumento da temperatura a 4°C/min até os 250°C, a partir dos quais aumentou para 300°C a 2°C/min, permanecendo a essa temperatura por 5 minutos. A injeção da temperatura foi aos 320°C. A identificação dos compostos foi efetuada com base nos seus derivados TMS comparando o espectro de massa com dados da biblioteca de espectros (NIST 2014; Wiley 2007; Shimadzu Pesticide Library) pelo programa *GCMSsolution software* versão 4.20 (Shimadzu). As áreas obtidas por integração dos picos permitiram calcular a concentração de cada composto através da equação 7:

$$[\text{composto lipídico}] = \frac{\frac{\text{Área do pico (composto lipídico)}}{\text{Área do pico (padrão interno)}} \times \text{Volume total}}{\text{declive (composto padrão)}} \times \% \text{ de gordura total (7)}$$

massa (resíduo lipídico)

3.3.5. Teor de proteína

O teor proteico foi determinado por análise elementar de % de azoto (N), através de condutividade térmica, utilizando um analisador Truspec 630-200-200. O teor de proteína foi calculado, utilizando o fator de conversão 6,25, através da equação 8:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\frac{\% N}{\text{massa da amostra (g)}} \times 5}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (8)$$

3.3.6. Teor de fibra dietética

Para a determinação do teor de fibra solúvel e insolúvel utilizou-se o *kit* de ensaio da Megazyme e seguiu-se o procedimento deste *kit* baseado nos métodos AOAC 985.29, 991.43 e AACC 32-05.01. Pesou-se 1 g de pó de alga num *erlenmeyer*. De seguida, adicionou-se 40 mL de solução tampão MES-TRIS (pH 8,2), 50 µL de enzima α-amilase termoestável, colocando-se posteriormente o *erlenmeyer* num banho de água a 100 °C por um período de 30 minutos (contabilizado a partir do momento em que a água atinge a temperatura correta). Os *erlenmeyers* foram posteriormente retirados do banho e colocados a arrefecer até à temperatura de 60°C. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de água destilada e, após estabilização da temperatura a 60°C, adicionaram-se 100 µL de enzima protease, tendo-se incubado a mistura num banho de água a 60°C por um período de 30 minutos. Após o período de incubação, adicionaram-se 5 mL de 0,56 N HCl, 6 gotas de HCl 5% e 200 µL da enzima amiloglucosidase, tendo a mistura sido incubada em banho a 60°C por um período de 30 minutos (contabilizado a partir do momento em que a temperatura do banho estabilizou nos 60°C).

Após a digestão enzimática referida anteriormente, determinou-se a fibra dietética insolúvel. Para tal, utilizaram-se cadinhos filtrantes com cerca de 1 g de celite previamente secos na estufa durante a noite a 105°C e tarados. Inicialmente adicionou-se cerca de 5 mL de água destilada de forma a redistribuir a celite pelo cadinho. A amostra digerida no passo anterior foi filtrada, sendo o resíduo obtido no cadinho (fibra insolúvel e celite) lavado duas vezes com 10 mL de água destilada pré-aquecida a 70°C. Os cadinhos contendo a fibra insolúvel foram lavados duas vezes com 10 mL de etanol 95% e 10 mL de acetona. O filtrado obtido neste passo foi utilizado para determinação da fibra dietética solúvel. Este filtrado (e lavagens de água) foi colocado num novo *erlenmeyer* onde se adicionou etanol (95%) a uma temperatura de 60°C

numa proporção de quatro vezes o volume do líquido recuperado, deixando-se a precipitar à temperatura ambiente durante uma hora. De seguida, efetuou-se a filtração com outros cadinhos contendo a celite. Inicialmente adicionou-se cerca de 15 mL de etanol 78% de forma a redistribuir a celite pelo cadinho. Posteriormente, a amostra foi filtrada e os cadinhos com o resíduo de fibra solúvel foram lavados duas vezes com cerca de 15 mL com etanol 78% e 95% e acetona pura.

Todos os cadinhos contendo a fibra insolúvel e solúvel, foram colocados durante a noite na estufa a uma temperatura de 105°C. No dia seguinte, foram retirados para um exsiccador e posteriormente pesados. Após a pesagem, o conteúdo dos cadinhos (amostra + celite) foi homogeneizado num almofariz, de forma a retirar cerca de 2 mg para análise de proteína. A restante amostra foi colocada novamente no cadinho, e colocados a incinerar na mufla a 525°C durante 5 horas. Após este período, os cadinhos foram retirados para o exsiccador e pesados após arrefecimento. A percentagem de fibra dietética solúvel e insolúvel foi calculada através das fórmulas representadas nas equações 9 e 10, respetivamente:

$$\text{Fibra dietética solúvel (\%)} = \frac{M_s - P_s - C_s}{M_a} \times 100 \quad (9)$$

$$\text{Fibra dietética insolúvel (\%)} = \frac{M_i - P_i - C_i}{M_a} \times 100 \quad (10)$$

Onde, M_s representa a massa do resíduo solúvel, P_s massa de proteína da fibra solúvel, e C_s massa de cinza solúvel, M_i representa a massa do resíduo insolúvel, P_i massa de proteína da fibra insolúvel, e C_i massa de cinza insolúvel.

3.3.7. *Quantificação e identificação de pigmentos*

Os pigmentos das macroalgas foram extraídos com acetona, na presença de 1% de 2,6-di-terc-butil-4-metil fenol (BHT), durante 24 horas, numa proporção de 1:100 (m:v) e protegidos da luz. Os extratos resultantes foram filtrados por filtro de *nylon* de porosidade 0,45 μm (WhatmanTM) e diluídos quando necessário, tendo a leitura dos espectros de absorvância sido efetuada num espectrofotómetro (Shimadzu, UVmini-1240), na gama dos 400 a 700 nm,

com recurso ao *software UVProbe*. A calibração do aparelho foi efetuada com solução de acetona com 1% (v:v) de BHT. A quantificação das clorofilas e de carotenoides foi efetuada através das equações descritas por Lichtenthaler (1987)⁸⁴:

$$[\text{Clorofila } a] = (11,24 \times \text{Abs } 661,6) - (2,04 \times \text{Abs } 644,8) \quad (11)$$

$$[\text{Clorofila } b] = (20,13 \times \text{Abs } 644,8) - (4,19 \times \text{Abs } 661,6) \quad (12)$$

$$[\text{Carotenoides}] = \frac{100 \times \text{Abs } 470 - 1,90 \times [\text{Clorofila } a] - 63,14 \times [\text{Clorofila } b]}{214} \quad (13)$$

A identificação das clorofilas e de carotenos e/ou xantofilas foi efetuada por análise de cromatografia líquida de ultra eficiência com um detetor de díodos, acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ). Para tal utilizou-se um aparelho Ultimate 3000 (Thermo SCIENTIFIC) equipado com um detetor de fotodíodos (3000RS-DAD), acoplado a um espectrómetro de massa LTQ XL Linear Ion Trap 2D. O sistema cromatográfico consistia numa bomba quaternária, um amostrador automático, um detetor de fotodíodo e um compartimento de coluna termostatzada. A análise foi efetuada com uma coluna Hypersil GOLD (100 mm de comprimento; 2,1 milímetros I.D. e 1,9 mm de diâmetro de partículas) mantida a 30°C, tendo o volume de injeção sido de 2 mL. A fase móvel para a separação dos extratos das macroalgas foi 0,1% ácido fórmico (v/v) (A) e acetronitrilo:metanol (70/30) (B). O gradiente de solvente iniciou com 85% de B, mantendo-se em modo isocrático durante 3,9 minutos, aumentando de seguida até aos 100% de B em 2,2 minutos e mantendo essas condições até aos 25 minutos, seguido do restabelecimento das condições iniciais. Antes da análise por UHPLC, cada extrato ou fração (5 mg) foi filtrado através de um filtro de *nylon* com um poro de 0,2 mm (Ge Healthcare Life Sciences, Reino Unido). A taxa de fluxo da corrida foi de 200 mL/min. Os dados espectrais de UV-Vis para todos os picos foram recolhidos numa gama de 219-450 nm, tendo os perfis cromatográficos sido registados a 280 nm. O espectrofotómetro de massa usado foi um LTQ XL Linear Ion Trap 2D (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização ortogonal de *electrospray* (ESI). As análises foram efetuadas em modo negativo com uma voltagem de 5,00 kV e temperatura do capilar de ESI a 275°C, aplicando-se uma energia de colisão de 20-25 eV nas fragmentações.

3.4. Tratamento estatístico

Os resultados experimentais são apresentados como média \pm desvio-padrão ou apenas média. As médias de todos os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), utilizado o *software* “GraphPad Prism 6”, tendo em seguida sido aplicado o teste *Tukey’s* a todos os parâmetros para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados das amostras testadas. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alterações físico-químicas na *Ulva rigida* por processamento e ao longo de tempo de armazenamento

4.1.1. Análise de parâmetros físicos

4.1.1.1 Análise de cor superficial

Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram registados para os diversos tratamentos de conservação, ao longo do tempo de armazenamento (0 - 180 dias), sendo os resultados apresentados na Figura 8. Tal como pode ser observado, em todas as condições de conservação, o parâmetro a^* apresentou valores negativos (verde). Ainda, verificou-se que as amostras recolhidas logo após o tratamento (t_0) não apresentaram diferenças significativas entre si, registando-se valores entre $-15,42 \pm 1,10$ (salmoura) e $-14,78 \pm 0,35$ (desidratada) (Figura 8A). Os valores deste parâmetro apresentaram no entanto tendência para aumentar durante o armazenamento, sendo este efeito menos acentuado na amostra desidratada. De facto, apesar de neste tratamento se verificar uma variação em a^* nos primeiros 30 dias (de $-14,78 \pm 0,35$ para $-13,08 \pm 0,95$ aos t_{30}), a partir dessa altura o seu valor foi mantido constante até t_{180} . Por outro lado, para esse tempo experimental os valores de a^* na amostra em salmoura e em salga a 28% e 40% eram de $-11,20 \pm 1,95$ (salga 28%) e $-10,35 \pm 1,23$ (salmoura), indicando uma perda significativa do tom verde destas macroalgas. É ainda de realçar que a perda desta tonalidade foi diferente entre os vários tratamentos com sal de cozinha, uma vez que a alga em salmoura apresentou uma ligeira diminuição do tom verde logo após 60 dias, enquanto nas amostras em salga esse comportamento só ocorreu aos 120 dias (t_{120}).

O parâmetro b^* da cor de *Ulva rigida* indicou valores localizados na zona do amarelo, não mostrando diferenças significativas entre os valores obtidos para as quatro condições de conservação em t_0 (Figura 8B). No entanto, ao longo do tempo de conservação, este parâmetro foi significativamente aumentado em todas as condições testadas, atingindo valores entre $45,64 \pm 2,48$ (salga 28%) e $47,41 \pm 2,86$ (desidratada), refletindo uma intensificação da tonalidade amarela das algas com o tempo de armazenamento.

O parâmetro L^* da cor da *U. rigida* (Figura 8C) indicou uma luminosidade intermédia ou cor cinza, i.e., os valores localizaram-se perto do centro do eixo L^* do gráfico tridimensional da cor superficial (0 – preto, 100 – branco). Não se verificaram diferenças significativas para

este parâmetro, nas quatro condições de conservação em t0, tendo este apresentado valores entre $48,64 \pm 2,48$ (salga 40 %) e $51,33 \pm 1,12$ (desidratada). No entanto, verificou-se uma tendência no aumento do valor deste parâmetro ao longo do tempo, sendo particularmente evidente nas condições de salga e salmoura em t180 [valores L^* variaram entre $53,46 \pm 2,65$ (salga 28%) e $54,61 \pm 2,22$ (salga 40%)]. Os resultados obtidos indicam que em todas as condições de conservação de *U. rigida* existiu um aumento de luminosidade, ficando as algas com uma cor mais clara.

Analisando os 3 gráficos da Figura 8 é possível sugerir que a perda de cor verde da alga *U. rigida* possa induzir a uma intensificação da sua tonalidade amarela e da sua luminosidade. Tal facto é consistente com a descoloração registada por observação direta da alga, tendo sido visível o aparecimento de manchas amarelas nas lâminas. Deve-se também destacar o facto de que, quando preservada em salga ou salmoura, a *U. rigida* tem tendência a perder mais cor verde do que quando desidratada. Tal facto está, provavelmente, associado à perda de componentes (ex. pigmentos) dissolvidos na água durante os processos de salga e salmoura⁸⁵.

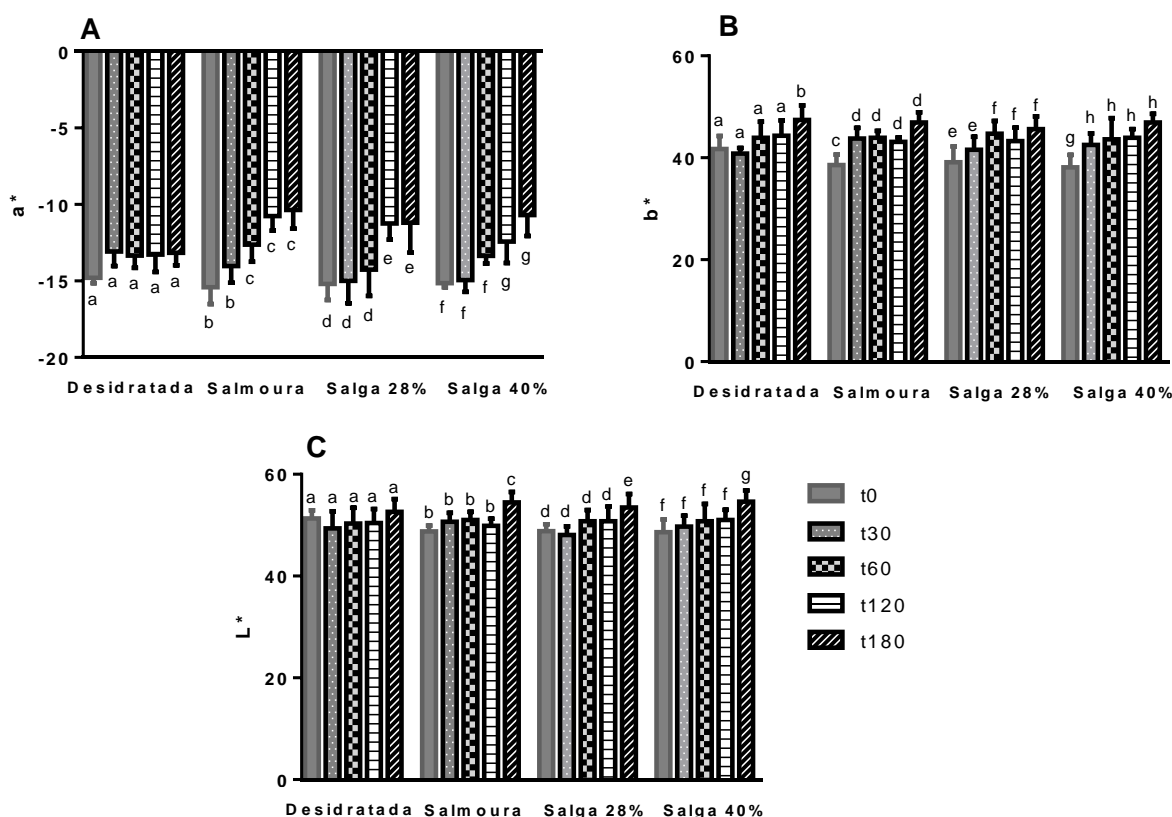


Figura 8. Variação do parâmetro a^* (A), b^* (B) e L^* (C) em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t_0 ($P < 0.05$, $n=3$).

O índice de escurecimento (IE) de *U. rigida* em t_0 variou na gama $105,04 \pm 11,81$ (salga 28%) e $115,51 \pm 6,37$ (desidratada), não sendo estatisticamente diferente entre as quatro condições de conservação. No entanto, este parâmetro foi aumentando ao longo do tempo de armazenamento das amostras, atingindo valores de $146,23 \pm 10,96$ (desidratada). Note-se que em todas as condições após t_{60} o valor IE foi mantido, no entanto, enquanto a alteração nas condições com sal foram graduais desde t_0 até t_{60} , a diferença de valores na amostra desidratada foi principalmente verificada entre t_{30} e t_{60} . Tal como verificado por Yadav *et al.*, é possível que o aumento dos valores de IE durante o tempo de armazenamento das algas seja resultante de fenómenos de acastanhamento enzimático, pois o sal de cozinha retarda o acastanhamento não enzimático⁸⁶.

O parâmetro croma pode ser descrito como a saturação de cor ou como a cor de uma área avaliada como uma proporção da luminosidade. Ao relacionar o parâmetro a^* e b^* , este parâmetro demonstra a cor real do objeto⁸⁶. Tal como pode ser observado na Figura 9B, as amostras de *U. rigida* possuíam uma saturação de cor baixa, com valores em t0 entre $40,73 \pm 2,28$ (salga 40%) e $43,84 \pm 2,39$ (desidratada), que não mostraram diferenças significativas entre as quatro condições de processamento. Ao longo do tempo de armazenamento, verificou-se uma tendência para aumentar o croma em todas as condições de conservação, sendo os valores mais elevados registados em t180 para as algas desidratada e em salga 40% ($49,21 \pm 2,87$ e $48,13 \pm 1,82$, respetivamente). As algas em salmoura e em salga 28% atingiram também valores significativamente mais elevados do que em t0 ($48,07 \pm 2,12$ e $47,01 \pm 2,78$, respetivamente), sendo no entanto este aumento menor que os das outras condições de conservação.

Assim, conclui-se que o parâmetro croma não diferiu entre condições de conservação, mas aumentou ao longo do tempo. Note-se que o aumento do croma coincide com uma cor mais escura do alimento, estando assim também relacionado com o aumento do valor de IE. Assim, conclui-se que o parâmetro croma não diferiu entre condições, mas aumentou ao longo do tempo para cada condição de conservação. Note-se que o aumento do croma coincide com uma cor mais escura do alimento, estando assim também relacionado com o aumento do valor de IE.

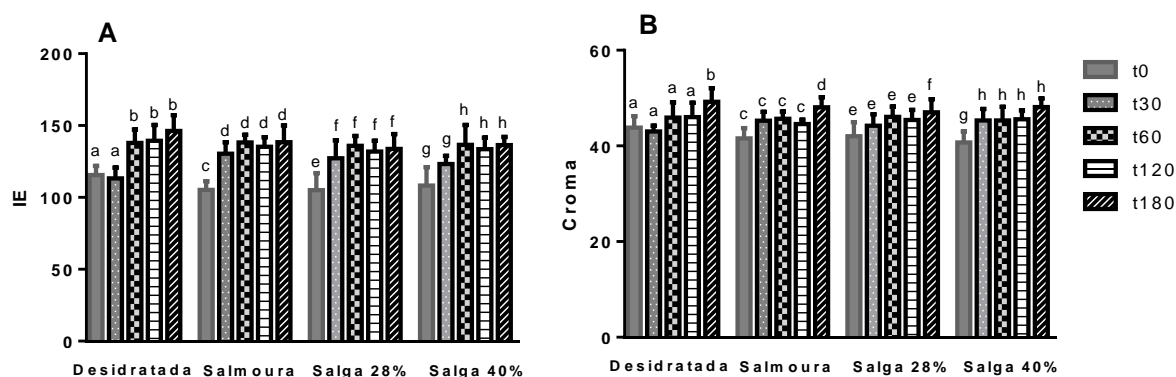


Figura 9. Variação dos parâmetros (A) índice de escurecimento e (B) croma, em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

A diferença absoluta de cor (ΔE) representa as alterações da cor superficial em função das coordenadas $L^*a^*b^*$ e é usada face a uma referência. Este parâmetro apresenta 3 graus de diferença de cor: $\Delta E > 3$ que indica muita diferença de cor, $1,5 < \Delta E < 3$ que indica alguma diferença e $1,5 < \Delta E$ que indica pouca diferença de cor⁸⁷. Os valores de ΔE obtidos para *U. rigida* sujeita a diferentes processamentos de conservação e ao longo do tempo de armazenamento encontram-se resumidos na Tabela 6.

Verificou-se diferenças de cor muito evidentes entre t0 e t30, sendo as diferenças mais acentuadas registadas para a salmoura e a salga 40%. A diferença de cor tornou-se ainda mais significativa com o aumento do tempo de armazenamento das amostras, atingindo valores entre 5,81 e 12,12, ao final de 180 dias. Salienta-se que as maiores alterações de cor foram observadas nas condições salmoura e salga 40% em t180, e as alterações menos acentuadas na alga desidratada.

Tabela 6. Comparação entre a diferença absoluta de cor (ΔE) em *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

CONDIÇÃO	ΔE			
	0-30 dias	0-60 dias	0-120 dias	0-180 dias
Desidratada	3,91 ^a	4,46 ^a	4,90 ^a	5,81 ^a
Salmoura	5,79 ^b	6,38 ^b	6,40 ^b	11,45 ^c
Salga 28%	3,77 ^d	6,55 ^d	6,91 ^d	9,21 ^e
Salga 40%	6,16 ^f	7,74 ^f	7,86 ^f	12,12 ^g

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes ($P < 0,05$, $n=3$)

4.1.1.2. Análise de textura

O manuseamento e processamento dos alimentos implicam alterações dos parâmetros físicos, incluindo a sua textura, podendo no caso da *U. rigida* verificar-se uma alteração na fraturabilidade da lâmina^{88,89}. Neste trabalho avaliou-se a alteração de fraturabilidade da *U. rigida* sujeita a diferentes processos de conservação, ao longo de 180 dias de armazenamento (Figura 10).

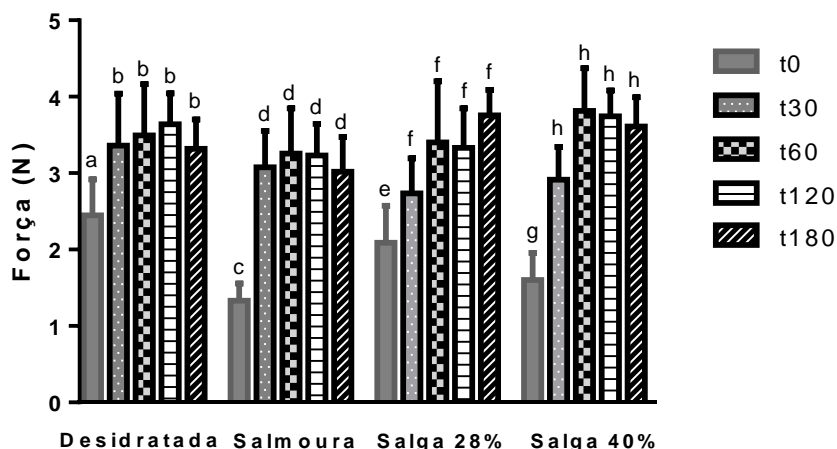


Figura 10. Variação da força (N) necessária para fraturar *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Das amostras recolhidas em t0, a macroalga desidratada foi a que apresentou maior resistência à fraturabilidade, com um valor de $2,52 \pm 0,49$ N, enquanto os valores das outras condições de conservação eram de $2,10 \pm 0,49$ N em salga 28%, $1,60 \pm 0,35$ N em salga 40% e $1,33 \pm 0,23$ N em salmoura. Estes resultados indicam que as algas sujeitas a tratamento com sal de cozinha manifestam menor resistência à perfuração do que as algas desidratadas. No geral, estas evidências estão de acordo com o trabalho de Prinzivalli *et al*⁹⁰, que mostraram que a desidratação por osmose, ou salga, diminui a quantidade de força necessária para perfurar o alimento.

Ao longo dos 180 dias de armazenamento, todas as amostras de *U. rigida* mostraram uma tendência para aumentar a sua resistência à fraturabilidade, que em média atingiu valores próximos de 3-4 N a partir de t60. Realça-se no entanto que, enquanto esta variação foi progressiva entre t0 e t60 nas salgas (28% e 40%), nas algas desidratadas e em salmoura ela

ocorreu apenas nos primeiros 30 dias de armazenamento. É possível que os aumentos de fraturabilidade registados ao longo do tempo de armazenamento nas diversas condições estejam parcialmente relacionados com a sua conservação a temperaturas baixas (aprox. 16,3° C para alga desidratada e 3-4° C para tratamento com sal de cozinha, ver registo de temperatura e humidade – anexo I), uma vez que o frio contribui para o aumento da firmeza dos alimentos⁹¹.

4.1.2. Análise aos parâmetros químicos

4.1.2.1. Teor de humidade relativa

O principal propósito da utilização de métodos de conservação (desidratação, salmoura ou salga) é a extensão do tempo de prateleira dos alimentos através da redução da atividade da água de modo a reduzir a atividade microbiana, atividade enzimática ou atividade química de um alimento. Por isso, qualquer aumento na humidade durante o armazenamento pode resultar numa deterioração mais rápida⁵⁸. A % de humidade relativa ao longo do tempo e para cada condição foi analisada em *U. rigida*, sendo os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Percentagem de humidade relativa de *Ulva rigida* ao longo do tempo para quatro condições de conservação.

CONDIÇÃO	% Humidade Relativa				
	t0	t30	t60	t120	t180
Desidratada	14,22±0,37 ^a	14,76±0,31 ^a	15,50±0,09 ^a	15,01±0,09 ^a	14,47±0,13 ^a
Salmoura	71,37±0,36 ^b	70,09±2,05 ^b	68,17±0,97 ^b	69,40±1,31 ^b	70,12±1,52 ^b
Salga 28%	70,86±5,05 ^c	61,92±1,03 ^d	61,43±2,49 ^d	62,63±1,58 ^d	62,98±1,01 ^d
Salga 40%	60,08±1,57 ^e	62,54±3,79 ^e	57,32±2,5 ^e	58,62±1,56 ^e	58,05±2,44 ^e

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio ± desvio padrão. Os valores de médias seguidas da mesma letra (na mesma linha) não são significativamente diferentes ($P < 0,05$, $n=3$).

Considerando que a humidade de *U. rigida* fresca é de aproximadamente 80% (dados do projeto SHARP, não mostrados) e que os dados de humidade relativa em todas as condições de conservação foram inferiores a esse valor, conclui-se que todos os tratamentos reduziram de

forma significativa a humidade das amostras (t0). Como esperado, a secagem por convecção da *U. rigida overnight* a 25°C induziu uma diminuição drástica no valor de humidade, para próximo de 14%. Já entre as algas salgadas, verificou-se que a salmoura e a salga a 28% reduziram de forma semelhante a humidade desta alga, registando um valor de 71% em t0, enquanto a salga a 40% provocou uma maior perda de água, apresentando um valor de $60,08 \pm 1,57\%$ de humidade relativa. Estas diferenças estão de acordo com o esperado, uma vez que a % de água de um alimento é influenciada pela quantidade de sal de cozinha adicionado, ou seja, quanto mais sal adicionado menor a % de água no produto⁸⁵.

Os dados experimentais registados permitiram ainda concluir que o valor da humidade relativa da *U. rigida* desidratada não variou significativamente ao longo dos 180 dias, indicando que as condições em que a alga foi mantida não afetaram este parâmetro. O mesmo comportamento ocorreu para as condições em salmoura e em salga 40%, sugerindo que nestas condições o equilíbrio osmótico foi atingido nas primeiras 4 horas (intervalo de tempo entre recolha e análise da amostra após chegada ao laboratório)⁸³. Por outro lado, a diferença dos valores da humidade entre t0 e t30 das amostras sujeitas a salga a 28% ($70,86 \pm 5,05$ e $61,92 \pm 1,03$) sugerem que nestas condições de sal de cozinha o estabelecimento do equilíbrio osmótico foi mais demorado.

4.1.2.2. Teor de cinzas

A fração mineral de algumas macroalgas corresponde a aproximadamente 36% (m/m) do peso seco total, no entanto, este valor depende de vários fatores. É também de esperar que a % de cinza seja variável ao longo do tempo de armazenamento, pois o estado de preservação ou degradação do material afeta a quantidade minerais^{6,17,76}.

Entre as condições de conservação em t0 (Figura 11) é de notar que a alga desidratada continha menor % de cinza ($12,20 \pm 0,61\%$) do que todas as outras condições. Dentro das amostras salgadas, os valores variaram entre $16,57 \pm 1,53\%$ (salmoura) e $21,14 \pm 2,83\%$ (salga 40%), sugerindo ter existido uma acumulação do sal de cozinha no interior das algas nestes tratamentos, não sendo este removido mesmo depois da sua lavagem (note-se que todas as algas foram re-hidratadas e lavadas antes de serem analisadas). Ao final de 180 dias de armazenamento, o valor das cinzas das algas era menor em relação comparativamente com o de

t0, em particular no caso das algas em salga a 28% e 40%, podendo este decréscimo estar associado à degradação da alga.

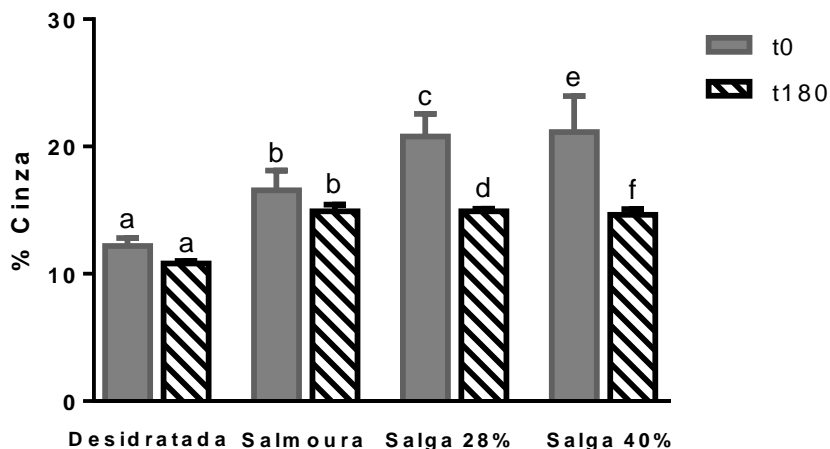


Figura 11. Percentagem de cinza de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

O projeto SHARP reportou valores de cinza em *U. rigida* que se encontram entre 26% e 38%, no entanto, os valores obtidos para alga desidratada e em salmoura encontraram-se abaixo deste intervalo, pois a alga utilizada neste trabalho foi lavada com água.

As descidas da % de cinza nas condições de conservação analisadas podem dever-se a degradação da alga e, no caso das salgas pode ainda ter ocorrido uma alteração na absorção de sal (NaCl) pela alga ao longo do tempo de armazenamento.

4.1.2.3. Teor de gordura total

Normalmente, os lípidos representam entre 1 e 5% do peso seco das macroalgas, no entanto, a variação de fatores como condições ambientais da cultura, desenvolvimento, recolha e processamento da alga podem influenciar o seu conteúdo, e a fração lipídica da *U. rigida* pode atingir, em alguns casos, 9% (m/m)^{4,14,35}. Assim, de modo a perceber as alterações na % de gordura total ao longo do tempo e para cada condição de conservação, efetuaram-se extrações com éter de petróleo no t0 e t180, sendo a % de gordura total apresentada na Figura 12.

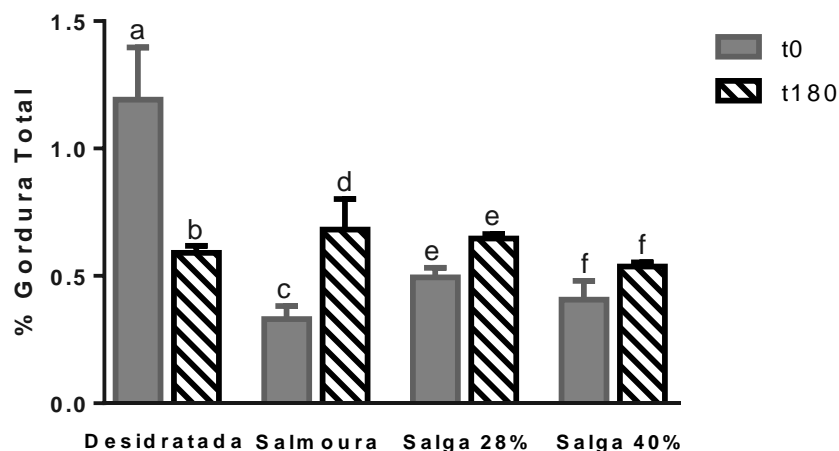


Figura 12. Percentagem de gordura total em base seca de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Em t0, a fração lipídica total recuperada de *U. rigida* foi muito variável nas 4 condições de conservação (entre $1,19 \pm 0,20\%$ - $0,33 \pm 0,05\%$), sendo o valor mais baixo correspondente ao da amostra em salmoura e o mais elevado obtido na amostra desidratada. Por outro lado, a % de fração lipídica recuperada em t180 foi cerca de 0,6% menor para a alga desidratada, enquanto o comportamento oposto foi observado nas condições restantes. Em maior detalhe, salmoura aumentou 0,35%, salga a 28% aumentou 0,15% e a salga a 40% aumentou apenas 0,13%. É possível que estas diferenças de valores resultem da rutura das paredes celulares das algas (após tratamento térmico (16h) ou exposição ao sal de cozinha) o que permite uma maior extração de gordura. No caso da alga desidratada, a diminuição do teor de gordura pode significar perda/oxidação dos lípidos em relação ao t0.

4.1.2.4. Quantificação e caracterização de ácidos gordos

As macroalgas do género *Ulva* são fontes de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, e na sua maioria oferecem uma notável composição, por exemplo, de ácidos gordos ω -3 e ω -6, ácido eicosapentanóico (C20:5), ácido docosapentanóico (C22:5) e outros como C18:4 ou C16:4^{14,93}.

De modo a identificar os compostos lipídicos presentes em *U. rigida* ao longo do tempo e para cada condição de conservação, realizaram-se análises ao extrato lipídico obtido da alga verde aos 0 e 180 dias, sendo os resultados apresentados na Tabela 8. De entre os compostos detetados no cromatograma, o ácido palmítico (C16:0) era o maioritário, apresentando a alga desidratada em t0 a maior concentração deste composto (1238,2 mg/kg). Ácido oleico (C18:1 ω -9) e derivados de colesterol estavam também presentes em concentrações elevadas em todas as condições de conservação, chegando a atingir respetivamente 323,2 mg/kg e 356,1 mg/kg, na condição desidratada. Para além destes compostos, verificou-se a presença de alguns sinais cromatográficos na alga desidratada (em t0) que não foram detetados em mais nenhuma amostra, nomeadamente o ácido octadecanóico (C18:0), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido docosanóico (C22:1 ω -3), ácido araquidónico (C20:4 ω -6), 6,9,12,15-octadecatetraenoato de butilo e 2-hexadecen-1-ol e 2-hexadeceno. Apenas 6 dos compostos referidos na Tabela 8 foram identificados nas amostras de *U. rigida* salgadas, designadamente o ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecenóico, ácido α -linoleico e ácido eicosapentaenóico.

Ao longo do tempo de armazenamento, a alga verde desidratada apresentou uma diminuição na concentração dos 6 compostos acima mencionados, o que vai de encontro à diminuição do teor de gordura recuperada em t180 (Figura 12). Por outro lado, nas amostras de alga sujeitas a salmoura e salga a 28% verificaram-se, para a maioria dos compostos, um aumento da sua concentração. Curiosamente, a *U. rigida* sujeita a salga a 40% apresentou uma diminuição da concentração de ácidos gordos em t180 comparativamente a t0, apesar do aumento de gordura recuperada (Tabela 8 e Figura 12).

Tabela 8. Comparação entre a concentração de compostos lipídicos em mg/kg de *Ulva rigida* seca ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação.

Condição	Desidratada		Salmoura		Salga 28%		Salga 40%	
	t0	t180	t0	t180	t0	t180	t0	t180
Ácidos Gordos								
Saturados								
Ác. Tetradecanóico	199,8 ^a	80,5 ^b	15,9 ^a	92,1 ^a	97,4 ^a	83,1 ^a	79,0 ^a	59,6 ^a
Ác. Hexadecanóico	1238,2 ^c	552,7 ^c	204,2 ^c	953,2 ^c	36,5 ^c	673,0 ^c	539,8 ^c	478,3 ^c
Ác. Octadecanóico	19,3 ^d	0,0 ^d	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. Pentadecanóico	9,9 ^e	0,0 ^e	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Insaturados								
Ác. 9-hexadecenóico	149,0 ^f	73,7 ^g	0,0 ^f	130,8 ^g	64,5 ^f	79,2 ^f	75,8 ^f	47,4 ^f
Ác. 9-octadecenóico	323,2 ^h	336,0 ^h	63,5 ^h	546,8 ⁱ	126,6 ^h	280,0 ^h	247,3 ^h	182,6 ^h
Ác. 9,12-octadecadienóico	55,4 ^j	73,7 ^j	20,5 ^j	91,0 ^j	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. α-linolénico	230,7 ^l	390,5 ^l	0,0 ^l	301,6 ^m	89,0 ^l	222,5 ^l	182,1 ^l	72,1 ^l
Ác. Docosanóico	89,9 ⁿ	0,0 ⁿ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. Eicosapentaenóico	115,3 ^o	0,0 ^p	0,0 ^o	162,7 ^p	301,7 ^o	240,1 ^o	198,8 ^o	33,1 ^p
Ác. Araquidónico	32,7 ^q	0,0 ^q	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ésteres de Ácidos Gordos								
6,9,12,15-Octadecatetraenoato de butilo	381,5 ^r	376,8 ^r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ΣA.G. Saturados	1467,2	633,2	220,1	1045,3	131,2	756,2	618,8	537,9
ΣA.G. Insaturados	996,3	874,0	84,0	1232,8	581,8	821,7	704,0	335,2
ΣΩmega 3	435,9	390,5	0,0	464,3	390,7	462,5	380,9	105,2
ΣΩmega 6	88,2	73,7	20,5	91,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Ómega 6/Ómega3	0,2	0,2	n.a	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
ΣEsteróis	356,1	632,0	168,8	361,5	251,3	306,2	296,0	73,8

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio. Para cada composto médias com a mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes ($P < 0,05$, $n=3$). n.a. – não aplicável.

No global, a quantidade total de ácidos gordos saturados e de insaturados para *U. rigida* desidratada e em salga 40% tendeu a diminuir ao longo do tempo. *U. rigida* apresentou concentrações de ácido gordos insaturados ω -3 consideravelmente maiores do que as de ácidos gordos insaturados ω -6, sendo a razão ω 6/ ω 3 na amostra desidratada próxima de 0,2. Note-se no entanto que as condições de conservação em salga seca não continham ω 6 e salmoura em t0 não continha ω 3, isto implicou uma razão ω 6/ ω 3 bastante baixa ou não existente. Realça-se o facto de que uma razão ω 6/ ω 3 baixa é considerada desejável pela organização mundial de saúde. Quantidades excessivas de ómega-6 promovem um aumento no risco de doenças cardiovasculares, cancro, etc., enquanto uma razão ω 6/ ω 3 baixa exerce efeitos supressivos, reduzindo o risco de doenças crónicas⁹⁴.

4.1.2.5. Teor de proteína

Tal como os restantes parâmetros químicos, o teor de proteína de *U. rigida* também varia com as condições ambientais e outros fatores. Apesar disso, macroalgas verdes atingem elevadas quantidades de proteína, podendo alcançar 50% (m/m) em algumas espécies, tornando-se importantes fontes de proteína alimentar¹⁶.

Os resultados de teor de proteína obtidos para a *U. rigida* sujeita a diferentes tratamentos de conservação e registados em t0 e t180 encontram-se apresentados na Figura 13. Tal como pode ser observado, as amostras apresentaram valores equivalentes de proteína (entre $21,45 \pm 0,06\%$ e $23,36 \pm 0,22\%$), que não foram sujeitos a alterações com o tempo de armazenamento estudado (180 dias).

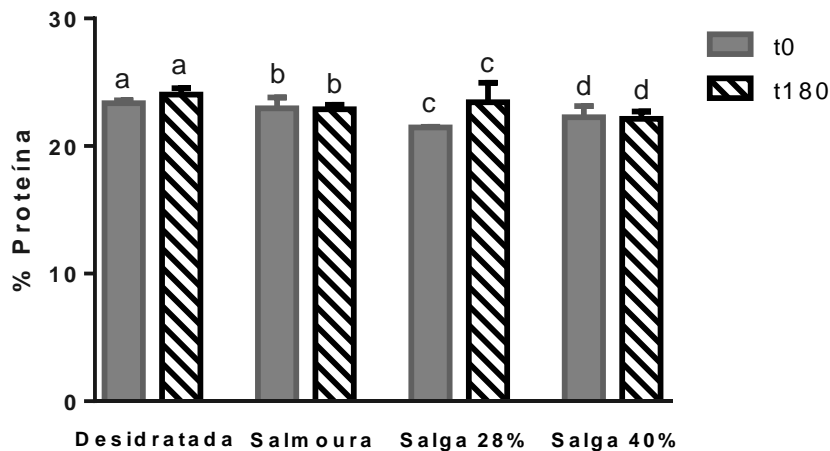


Figura 13. Percentagem de proteína em base seca de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Dere *et al.* reportou valores de % de proteína para *U. rigida* que se aproximaram de 30%⁹⁵. O facto de não se verificarem variações de valores proteicos entre as condições de conservação em t0, nem para cada condição ao longo do tempo, sugere que todas as condições de conservação em conjunto com o embalamento protegeram a alga da degradação de proteínas.

4.1.2.6 Teor de fibra dietética

As macroalgas contêm grandes quantidades de fibra dietética, atingindo valores mais elevados que em frutas ou vegetais⁸². Tal pode ser observado na Figura 14, as alterações na % de fibra solúvel, insolúvel e total, ao longo do tempo e para cada condição de conservação foram analisadas em *U. rigida* (Figura 14).

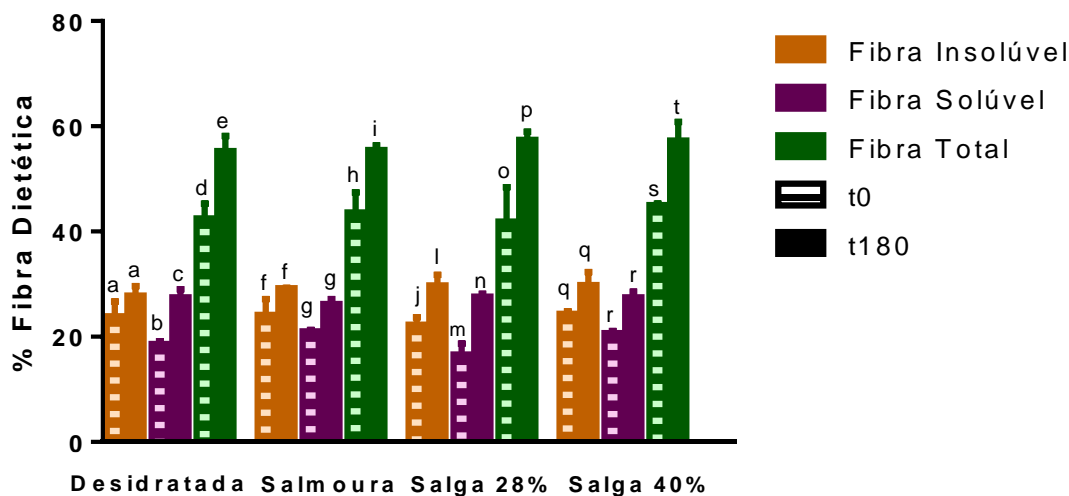


Figura 14. Percentagem de fibra dietética em base seca de *Ulva rigida* ao longo de 180 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Para cada tipo de fibra dietética médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Considerando que a quantidade de fibra reportada por Fleurence *et al.* para algas se encontra entre 33 e 62%¹⁶, os valores obtidos são concordantes. No geral os valores registados de fibra insolúvel foram superiores aos de fibra solúvel, para todas as condições de conservação em t0, encontrando-se numa gama 22,30-24,33 e 16,63-21,02, respetivamente. Além disso, verificou-se que os valores de fibra registados em t0 eram equivalentes para as várias amostras. Relativamente a este tempo experimental, em t180 todas as amostras apresentaram uma maior % de fibra total, refletindo uma tendência para acréscimo de fibra solúvel e insolúvel nas amostras. Note-se que o aumento de % de fibra nas algas em t180 é provavelmente uma consequência da diminuição/degradação de outros componentes (por exemplo lípidos).

4.1.2.7. Quantificação e identificação de pigmentos

As algas são organismos fotossintéticos capazes de sintetizar 3 tipos de pigmentos: clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, sendo estas classificadas em *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas castanhas) e *Rhodophyceae* (algas vermelhas), de acordo com o tipo de pigmentos que possuem. A cor verde de *U. rigida* deve-se à presença de clorofilas *a* e *b*, no entanto esta alga também contém carotenoides⁹⁷.

A Figura 15 representa o perfil cromatográfico representativo da macroalga *U. rigida* desidratada, salmoura, salga a 28% e salga a 40%, a 655 nm e a Tabela 9 resume os dados relativos ao espectro de visível e do ião protonado $[M-H]^+$ dos pigmentos identificados.

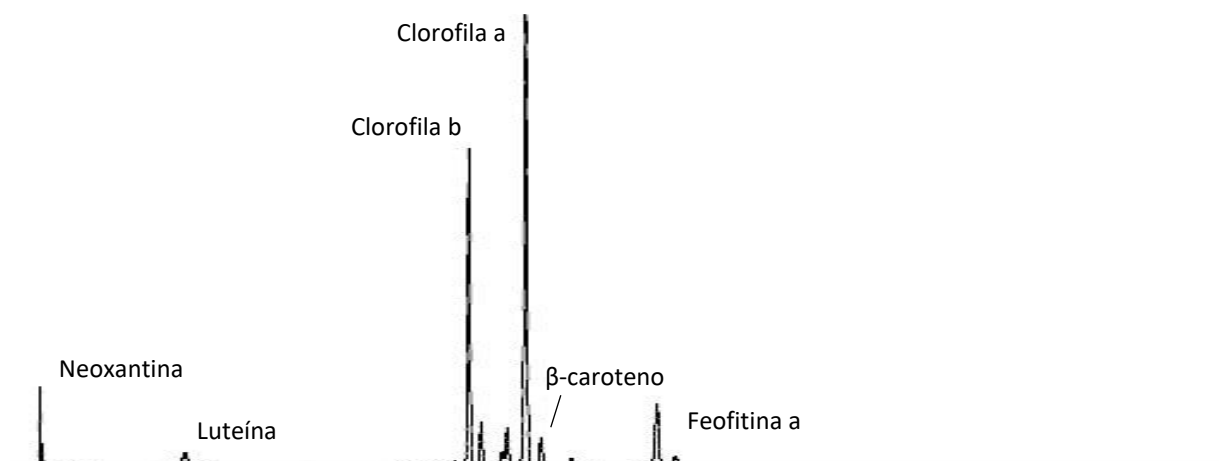


Figura 15. Cromatograma representativo do extrato de acetona das macroalgas *Ulva rigida* desidratada, em salmoura, em salga a 28% e em salga a 40%.

Pela análise dos cromatogramas foi possível confirmar que todas as amostras de *U. rigida* em estudo possuíam clorofilas *a* como *b*, assim como feofitina *a* (pigmento derivado da clorofila *a*) e carotenoides (luteína, neoxantina e β -caroteno). Por motivos de indisponibilidade do equipamento LC-MS, a quantificação dos pigmentos das macroalgas neste trabalho foi efetuada por recurso a métodos colorimétricos.

Tabela 9. Dados de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ relativos aos pigmentos identificados nos extratos de *Ulva rigida* para todas as condições de conservação.

Composto	$\lambda_{m\acute{a}x}$	$[M-H]^+$
Neoxantina	414, 436, 465	601,5
Luteína	420, 445, 473	568,5
Clorofila <i>b</i>	462, 599, 648	907,5
Clorofila <i>a</i>	430, 617, 663	893,5
β -Caroteno	451, 475	536,5

Feofitina <i>a</i>	408, 607, 665	871,6
--------------------	---------------	-------

Na Figura 16 encontram-se representados os conteúdos de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C). Em t0, a clorofila *a* apresentou valores entre $4,14 \pm 0,60 \mu\text{g/mg}$ (desidratada) e $0,97 \pm 0,44 \mu\text{g/mg}$ (salga a 40%). Enquanto a clorofila *b* apresentou valores que variaram entre $3,39 \pm 0,29 \mu\text{g/mg}$ (desidratada) e $2,08 \pm 0,50 \mu\text{g/mg}$ (salga a 40%). Os carotenóides foram os pigmentos que apresentaram uma concentração mais baixa, variando de $0,71 \pm 0,14 \mu\text{g/mg}$ (desidratada) e $0,41 \pm 0,16 \mu\text{g/mg}$ (salga a 28%).

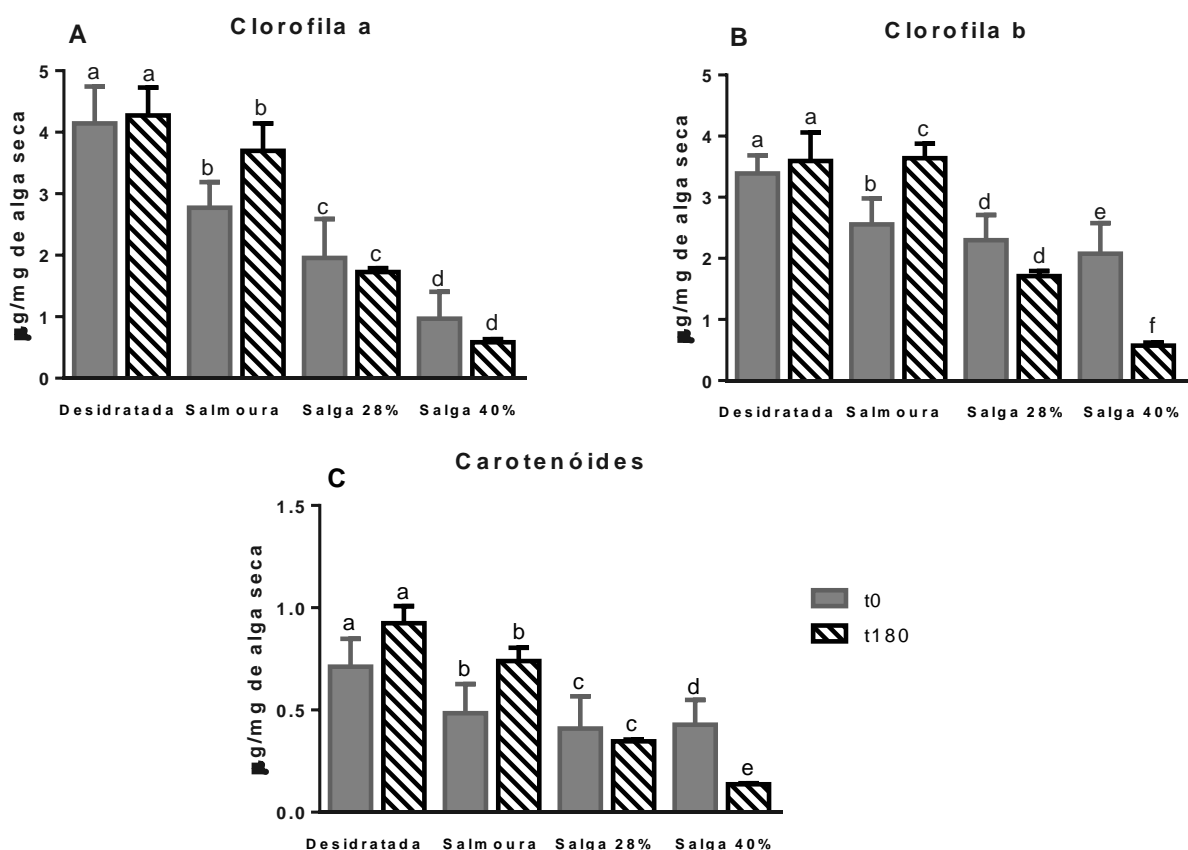


Figura 15. Concentração em $\mu\text{g/mg}$ de base seca de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C) em *Ulva rigida* para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Os pigmentos mais abundantes em todas as condições de conservação *U. rigida* foram a clorofila *a* e a clorofila *b*). Para clorofila *a* não há alterações significativas da concentração ao longo dos 180 dias, embora pareça existir uma tendência para aumentar a concentração de

clorofila *a* no extrato de salmoura e uma tendência para diminuir no extratos em salga seca, bastante evidenciado no tratamento com salga 40%. Para clorofila *b* a tendência foi semelhante à de clorofila *a*, no entanto a alga em salmoura aumentou significativamente e a alga em salga 40% diminuiu significativamente. O tratamento de conservação de salga 40% foi o que afetou mais drasticamente a alga, pois também se verificou uma diminuição significativa de carotenoides em *U. rigida* ao longo dos 180 dias.

É de notar de que em t180 a alga conservada por desidratação ou salmoura apresentou concentrações mais elevadas para os pigmentos analisados que quando a alga é conservada em salga 28% ou salga 40%, assim, as condições desidratada e salmoura conservaram melhor *U. rigida*. No entanto, estes resultados não estão relacionados com o *stress* salino ocorrido durante a conservação pois, segundo Xia *et al.*, o *stress* salino não influencia a concentração de pigmentos, pode-se então explicar-se o ocorrido pela perda de água durante a salga^{85,98}. Também há perda de água durante a desidratação por convecção e durante a salmoura, mas ocorre de modo diferente do da salga. Isto é, durante a conservação por salga e salmoura há trocas, pois enquanto a água se desloca para o exterior da alga também o sal de cozinha se desloca no sentido oposto⁸⁵, o que pode implicar uma degradação de pigmentos que não acontece na desidratação por convecção. Também a salmoura não foi afetada por este fenómeno pois ao contrário da salga em que a alga se mantém na solução de sal de cozinha durante todo o prazo de validade, a salmoura apenas esteve em solução aproximadamente 5 minutos, permitindo uma melhor conservação dos pigmentos⁹⁹.

4.2. Alterações físico-químicas na *Gracilaria sp* por processamento e ao longo de tempo de armazenamento

4.2.1. Análise aos parâmetros físicos

4.2.1.1. Análise de cor superficial

Devido a alterações ou lesões do tecido ocorridas durante o processamento, a alga *Gracilaria sp.* também sofre alterações nos seus parâmetros físicos ao longo do tempo. Por ser estruturalmente diferente de *U. rigida*, não foi possível realizar a análise de textura nesta alga, procedendo-se apenas ao registo de cor superficial^{1,89}. Os parâmetros L*, a* e b* da *G. sp.* foram registados para os diversos tratamentos de conservação, ao longo do tempo de armazenamento (0 - 60 dias), sendo os resultados apresentados na Figura 17.

Em todas as condições de conservação, o parâmetro a* apresentou valores positivos (vermelho). No entanto, em t0, estes variavam significativamente entre os vários tratamentos de conservação, sendo o mais baixo correspondente à alga desidratada ($9,62 \pm 0,80$) e o mais elevado obtido para a alga em salmoura ($13,42 \pm 0,90$). A variação do a* ao longo do tempo de armazenamento também não seguiu a mesma tendência em todos os tratamentos: enquanto as algas desidratadas, e em salga seca apresentaram uma diminuição gradual do seu tom vermelho atingindo valores entre $14,48 \pm 1,05$ (salmoura) e $7,83 \pm 0,77$ (desidratada), respetivamente, a *G. sp.* sujeita a tratamento de salmoura registou uma intensificação do seu tom vermelho em t30, mantendo-se estável até aos 60 dias de armazenamento.

Os valores registados para o parâmetro b* (Figura 17 B) corresponderam à zona do amarelo para todas as condições de conservação ao longo do tempo. *G. sp.* apresentou nos dados iniciais (t0) um valor para a alga desidratada ($5,25 \pm 0,78$) mais baixo que das condições de conservação e um valor da alga em salga 28% mais elevado ($6,80 \pm 0,76$) de todas as condições. Avaliando as variações de b* ao longo dos 60 dias, notou-se que as algas desidratadas, em salga 28% e em salga 40% diminuíram o seu tom de amarelo. Esta diminuição foi de 1,58 para a salga 28%, 1,57 para a salga 40% e 1,10 para a alga desidratada, sendo, caso das salgas, uma diminuição mais drástica em t30 e no caso da alga desidratada a diminuição foi gradual ocorrendo apenas em t60. Contudo, a alga em salmoura contrariou a tendência as outras condições não apresentando variações ao longo do tempo, e mantendo o seu tom amarelo.

Os valores de L^* indicam que *G. sp.* tem tendência a ser uma alga escura (Figura 17 C), ficando localizados perto do extremo '0' do eixo L^* do gráfico tridimensional da cor superficial (0 – preto, 100 – branco). O parâmetro L^* da cor de *G. sp.* apresentou valores das condições de conservação em t0 entre $18,35 \pm 1,15$ (desidratada) e $20,44 \pm 1,29$ (salga 28%). Ao longo dos 60 dias de armazenamento, as algas desidratadas e em salga a 28% apresentaram uma diminuição gradual dos valores deste parâmetro, tendo esta decorrido em t30 na primeira condição e apenas em t60 na salga a 28%. Por outro lado, *U. rigida* em salmoura apresentou uma intensificação da sua luminosidade nos primeiros 30 dias, mantendo-se até ao final tempo do ensaio (t60), enquanto a alga em salga a 40% não apresentou variações ao longo do tempo.

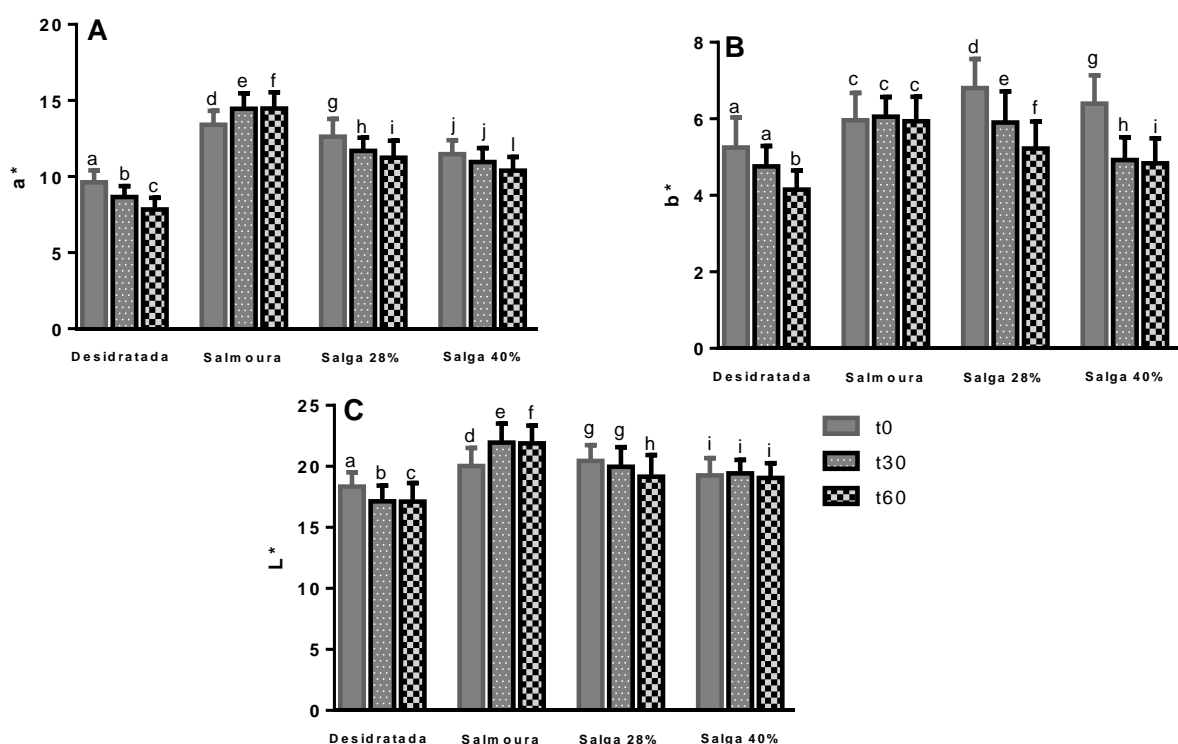


Figura 17. Variação do parâmetro a^* (A), b^* (B) e L^* (C) em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Analisando os 3 gráficos em conjunto pode-se constatar que das várias condições utilizadas, o método de conservação em salmoura é diferenciador no que se refere à manutenção das tonalidades vermelha, amarelo e luminosidade da *G. sp.*

O índice de escurecimento (IE) de *Gracilaria sp.* (Figura 18A) apresentou valores para as condições de conservação em t0 entre 70e 82. No tempo t0 a alga desidratada foi a condição que apresentou menor valor de IE, enquanto as outras 3 condições apresentaram valores semelhantes entre si. Ao longo dos 60 dias de armazenamento, as algas desidratada, em salga a 28% e salga a 40%, sofreram uma diminuição do seu valor de IE, tendo o efeito ocorrido nos primeiros 30 dias nas algas em salga, mantendo-se estável até t60, enquanto a diminuição na alga desidratada foi gradual durante os 60 dias do ensaio. Apenas a alga em salmoura não apresentou variações ao longo do tempo.

O parâmetro croma de *G. sp.* (Figura 18B) apresentou valores das condições de conservação em t0 que variaram de 11,04±0,83 (desidratada) e 14,70±0,89 (salmoura). A alga desidratada apresentou um croma menor que o das restantes condições, enquanto os valores para a alga em salmoura e salga a 28 % (14,36±1,24) eram mais elevados do que os das restantes condições. Ao longo dos 60 dias, as algas desidratadas, em salga a 28% e salga a 40% diminuíram a sua saturação de cor gradualmente, enquanto a alga em salmoura mostrou o comportamento oposto. Assim, conclui-se que o parâmetro croma diferiu entre condições, aumentando apenas para salmoura.

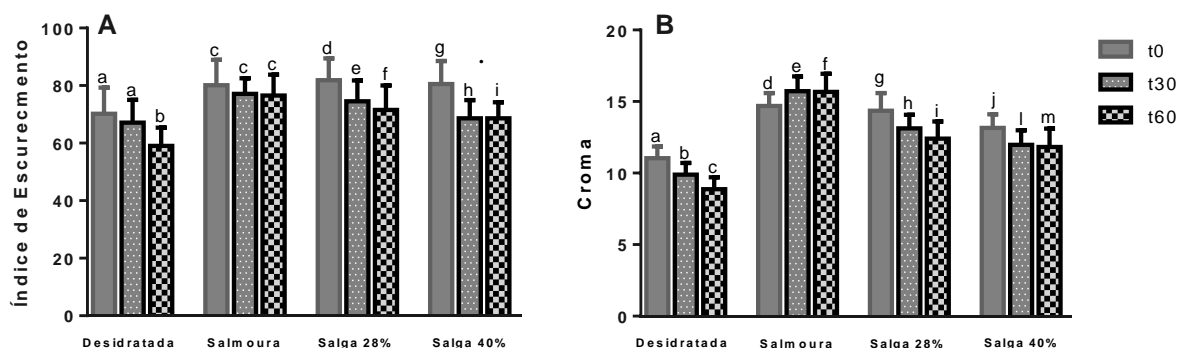


Figura 18. Variação do índice de escurecimento (A) e parâmetro Croma (B) em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

A diferença absoluta de cor (ΔE) representa as alterações da cor superficial em função das coordenadas $L^*a^*b^*$ e é usada face a uma referência (t0). Este parâmetro apresenta 3 graus de diferença de cor que foram referidos no tópico 4.1.1.1⁸⁷. Os valores obtidos da diferença

absoluta de cor (ΔE) da *G. sp.* estão reportados na Tabela 10, notando-se que todos os valores se encontram abaixo de 3 e acima de 1,5 o que indica alguma diferença de cor em relação a t0.

Conclui-se que existe uma tendência para aumentar o ΔE ao longo dos 60 dias, sendo este comportamento mais evidente na alga desidratada e em salga a 28 %, enquanto o oposto se verificou em salmoura.

Tabela 10. Comparação entre a diferença absoluta de cor (ΔE) em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação.

CONDIÇÃO	ΔE	
	0-30 dias	0-60 dias
Desidratada	1,72 ^a	2,40 ^a
Salmoura	2,31 ^b	1,71 ^b
Salga 28%	1,52 ^c	2,52 ^c
Salga 40%	1,76 ^d	1,75 ^d

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio. Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes ($P < 0,05$, $n=3$)

4.2.2. Análises de parâmetros químicos

4.2.2.1. Teor de humidade relativa

Gracilaria sp. é uma alga que também está sujeita a deterioração ao longo do tempo, por isso, a utilização dos mesmos métodos de conservação (desidratação, salmoura ou salga) também ajudou a estender o tempo de prateleira dos alimentos através da redução da atividade da água do alimento⁵⁸. A % de humidade relativa de *Gracilaria sp.* ao longo do tempo e para cada condição foi analisada, sendo os dados recolhidos apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Percentagem de humidade relativa de *Gracilaria sp.* ao longo do tempo para quatro condições de conservação.

CONDIÇÃO	% HUMIDADE RELATIVA		
	0 dias	30 dias	60 dias
Desidratada	7,27±0,44 ^a	8,96±0,14 ^a	9,85±0,74 ^a
Salmoura	71,48±0,14 ^b	70,72±0,11 ^b	71,85±0,61 ^b
Salga 28%	65,65±1,40 ^c	65,41±1,42 ^c	65,30±1,50 ^c
Salga 40%	64,08±0,78 ^d	62,79±0,78 ^d	61,67±2,89 ^d

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes ($P < 0,05$, $n=3$).

Em t0, a % de humidade da *G. sp.* desidratada apresentou o valor mais baixo das quatro condições (7,27±0,44%), enquanto a alga em salga (28% e 40%) apresentaram valores intermédios (64,08±0,78% e 65,65±1,40%) e a alga em salmoura apresentou o valor mais elevado (71,48±0,14%). Estas diferenças são semelhantes às de *Ulva rigida*, ou seja, a adição de sal de cozinha permite uma percentagem de água no produto final que foi influenciada pela absorção de sal do produto e, no caso da desidratação osmótica quanto maior a % de sal usada menor é a % humidade na alga ⁸⁵.

Ao longo dos 60 dias, a humidade relativa das amostras, para cada condição, não variou de forma significativa, sugerindo que o equilíbrio osmótico foi atingido nas primeiras 4 h após a aplicação dos tratamentos⁸³. Realça-se ainda que os dados registados indicam que as condições de armazenamento da alga desidratada (% de humidade relativa do armazém <60%) foram adequadas, verificando-se apenas uma pequena tendência para aumentar a % de humidade em 2,58%, no entanto este aumento não foi significativo.

4.2.2.2. Teor de cinzas

A fração mineral das macroalgas depende de vários fatores, e a sua composição e valor nutricional são altamente variáveis. A *G. sp.* tende a apresentar valores elevados de minerais, atingindo aproximadamente 26% (m/m). Espera-se a variação de % de cinza ao longo do tempo

é esperada, pois o estado do material afeta a quantidade minerais^{6,38,76}. A % de cinza (Figura 19) de *G. sp.* em t0 foi $6,02 \pm 0,49\%$ na alga desidratada, $12,87 \pm 0,83\%$ em salmoura, $11,65 \pm 0,49\%$ em salga a 40% e $26,63 \pm 2,17\%$ em salga a 28%.

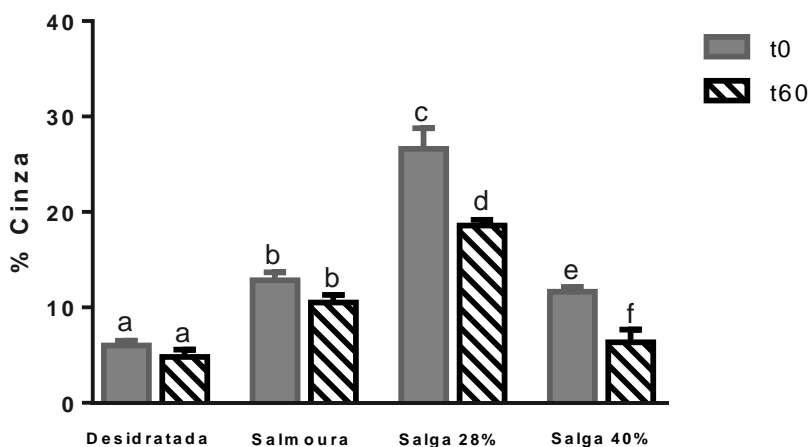


Figura 19. Percentagem de cinza de *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Em t0 a % de cinza da alga em salga 28 % foi a mais elevada das condições de conservação e a % de cinza da alga desidratada foi a menor das condições de conservação. Estas diferenças podem dever-se aos mesmos factos explicados para *U. rigida*, podendo ter existido uma acumulação do sal de cozinha no interior das algas nos tratamentos em salga, não sendo este removido mesmo depois da sua lavagem.

Ao longo do tempo apenas as algas em salga 28% e 40% apresentaram diminuição da % de cinza atingindo valores de $18,59 \pm 0,59\%$ e $6,35 \pm 1,33\%$, respetivamente. As algas desidratadas e em salmoura apenas apresentaram uma tendência para diminuir a % de cinza. A diminuição da % de cinza pode estar relacionada com a degradação da alga e, no caso das salgas secas pode ainda ter ocorrido uma alteração na absorção de sal (NaCl) pela alga ao longo do tempo de armazenamento.

4.2.2.3. Teor de proteína

O teor de proteína de *G. sp.* também varia com as condições ambientais e de desenvolvimento da cultura. No entanto, tal como *U. rigida*, também atinge quantidades de proteína elevadas, podendo representar 50% (m/m) do seu peso seco^{16,52}. *G. sp.* é uma alga cujos pigmentos acessórios ou ficobiliproteínas são proteínas, contribuindo para o seu teor proteico elevado². Curiosamente, em t0, a condição em salmoura apresentou um valor proteico mais elevado ($25,21 \pm 0,19\%$) do que o registado nos outros tratamentos ($23 \pm 0,30\%$ para a desidratada, $22,45 \pm 1,03\%$ para a salga 28% e $21,90 \pm 0,18$ para a salga 40%) (Figura 20), devendo ser sujeito a confirmação adicional. Os resultados obtidos permitiram ainda verificar um decréscimo de conteúdo proteico da *G. sp.* na condição de salmoura e salga 28% ao longo dos 60 dias de ensaio, que atingiram valores de $19,66 \pm 0,33$ e $19,81 \pm 0,58$, respetivamente.

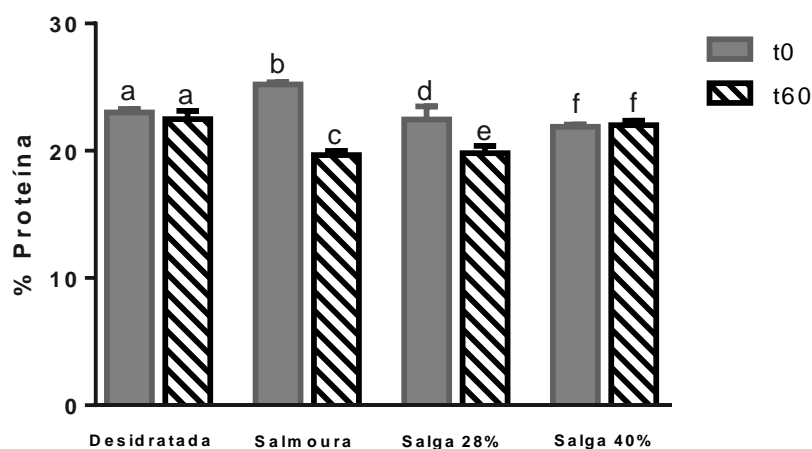


Figura 20. Percentagem de proteína em base seca de *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Os valores obtidos são próximos dos registados por Cirik *et al.* para *G. sp.*, que se aproximam de 20%⁵³. No entanto, há uma tendência para diminuir a % de proteína, o que indicou que a degradação de proteínas pode ser significativa depois dos 60 dias, podendo grande desta degradação ser causada pelos pigmentos, ficobiliproteínas. O facto de haver pequenas variações entre as condições em t0, e para cada condição ao longo do tempo pode significar que as condições de desidratação e de salga 40% em conjunto com o embalamento protegeram a alga da degradação de proteínas.

4.2.2.4. Quantificação e identificação de pigmentos

As algas vermelhas, como *G. sp.*, são capazes de sintetizar 3 tipos de pigmentos: clorofilas (*a*), carotenoides e ficobiliproteínas. No entanto, a sua cor deve-se essencialmente à presença de ficobiliproteínas, que mascaram a presença das clorofilas e dos carotenoides^{2,97}.

A Figura 21 representa o perfil cromatográfico representativo das macroalgas *G. sp.* desidratadas, em salmoura, em salga 28% e em salga 40%, a 655 nm e a tabela 12 resume os dados relativos ao espectro de visível e do ião protonado $[M-H]^+$ dos pigmentos identificados.

Figura 21. Cromatograma representativo do extrato de acetona das macroalgas *Gracilaria sp.* desidratada, em salmoura, em salga 28% e em salga 40%.



Pela análise dos cromatogramas é possível verificar que na macroalga *G. sp.*, a clorofila *b* não foi identificada, apresentando estas apenas clorofila *a* e produtos derivados (feorbidina *a*). Adicionalmente, não se verificou a presença de carotenoides na *Gracilaria*. Por motivos de indisponibilidade do equipamento LC-MS, a quantificação dos pigmentos das macroalgas neste trabalho foi efetuada por recurso a métodos colorimétricos.

Tabela 12. Dados de UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ relativos aos pigmentos identificados no extrato de *Gracilaria sp* para todas as condições de conservação.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$	$[M-H]^+$
Clorofila <i>a</i>	430, 617, 663	893,6
Feorbidina <i>a</i>	408, 608, 664	593,4

As alterações na concentração de clorofilas ao longo do tempo e para cada condição foram analisadas por espectrometria UV em *G. sp.* Os dados recolhidos permitiram determinar a concentração de clorofila *a* (Figura 22). A concentração de clorofila *a* em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de *G. sp.*

(Figura 22) no tempo inicial apresentou para todas as condições de conservação uma variação entre $1,24 \pm 0,10 \mu\text{g/mg}$ (desidratada) e $0,72 \pm 0,13 \mu\text{g/mg}$ (salga a 40%). Ao longo do tempo apenas a alga desidratada não apresentou variações, a alga em salmoura e as salgas apresentaram diminuições da concentração de clorofila *a*, sendo, no caso da salmoura, uma diminuição mais acentuada ($0,21 \pm 0,06 \mu\text{g/mg}$).

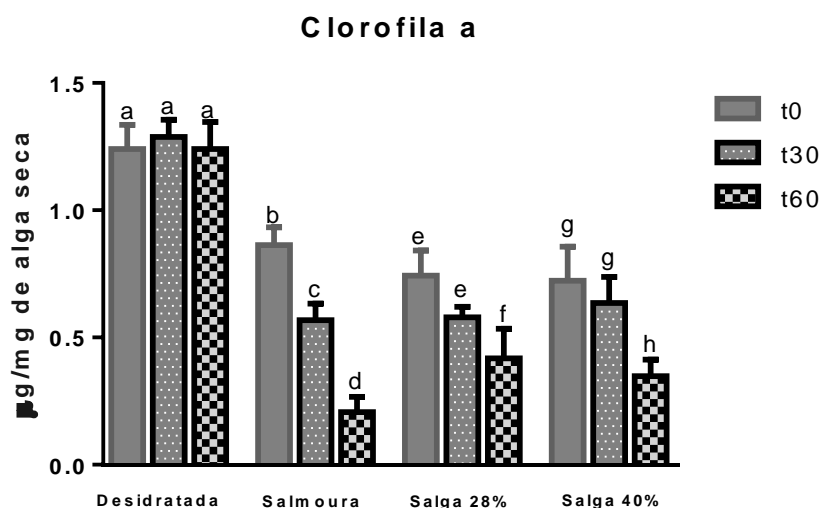


Figura 22. Concentração em $\mu\text{g/mg}$ de base seca de clorofila *a* em *Gracilaria sp.* ao longo de 60 dias para quatro condições de conservação. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na mesma condição de conservação não são significativamente diferentes de t0 ($P < 0.05$, $n=3$).

Esta diminuição de clorofila *a* na alga vermelha em salmoura pode parecer contraditória com o aumento dos parâmetros de cor $L^*a^*b^*$. No entanto, deve realçar-se que a cor destas algas é essencialmente determinada pelas ficobiliproteínas e que a degradação de clorofila *a* poderá realçar a cor das ficobiliproteínas, tornando a alga mais vermelha.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, as macroalgas *Ulva rigida* e *Gracilaria sp.* foram sujeitas a 4 tratamentos de conservação (desidratação, salmoura, salga 28% e salga 40%), tendo-se avaliado alterações de parâmetros físico-químicos, ao longo de tempo de armazenamento (180 dias para *U. rigida* e 60 dias pra *G. sp.*).

Em relação aos parâmetros físicos, a cor superficial da *U. rigida* aumentou os valores dos parâmetros $L^*a^*b^*$ ao longo dos 180 dias para todos a condições de conservação, ficando com um tom verde mais claro. A diminuição mais acentuada de cor aconteceu nas condições de conservação com sal de cozinha. Os valores de IE e croma também aumentaram ao longo do tempo em todas as condições de conservação de *U. rigida*. No caso de *G. sp.*, os valores dos parâmetros $L^*a^*b^*$ diminuíram na alga desidratada e em salga 28% e 40%, no entanto, a alga vermelha conservada em salmoura apresentou aumentos nos parâmetros $L^*a^*b^*$, indicando que esta condição conservou melhor a cor de *G. sp.*, pois esta condição é também a única que manteve o valor de IE e em que o croma aumentou. As análises à textura que revelaram que *U. rigida* se tornou mais resistente à fraturabilidade ao longo do tempo e em todas as condições.

Todas as condições de conservação usadas nas macroalgas *U. rigida* e *G. sp.* diminuíram a percentagem da humidade relativa de modo a que não haja proliferação de microrganismos, no entanto, apesar da percentagem de humidade relativa se manter ao longo do tempo houve degradação de nutrientes ou alteração dos mesmos por parte das condições de conservação. O teor de cinza é semelhante nas duas macroalgas e sempre mais alto nas condições que preservam em sal de cozinha do que a condição desidratada, sendo a cinza um dos nutrientes afetados pelo tipo de conservação. Quanto ao teor de gordura, este é maior na alga desidratada, sendo esta condição a que conserva melhor os ácidos gordos, no entanto, estes degradaram-se ao longo do tempo, demonstrando uma diminuição da concentração dos vários compostos lipídicos ao longo do tempo. Todas as condições apresentaram uma razão $\omega 6/\omega 3$ baixa que ajuda a combater doenças crónicas. O teor de proteína é também aproximado entre as duas algas e mantém-se ao longo do tempo, parecendo ser um dos poucos nutrientes que são pouco afetados pelo tipo de conservação ou pelo tempo de armazenamento. O teor de fibra apresentou para todas as condições de conservação maior percentagem de fibra insolúvel em relação à fibra solúvel, no entanto, os dois tipos de fibra aumentam a sua percentagem ao longo do tempo. Os pigmentos

das algas apresentarem para *U. rigida* grande variedade, havendo clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e carotenoides como neoxantina, luteína e β -caroteno. Em relação à quantificação destes pigmentos, houve uma tendência para diminuir a concentração destes pigmentos ao longo do tempo nas algas em salga seca, mantendo ou aumentando a concentração nas algas desidratadas e em salmoura. Em *G. sp.* apenas se identificou clorofila *a* e feorbidina *a* em todas as condições de conservação, havendo uma tendência para diminuir a concentração de clorofila *a* ao longo do tempo nas alga tratadas com sal de cozinha, que se manteve na alga desidratada.

Em conclusão, e tendo em conta as análises realizadas em cada alga a condição de conservação que conserva melhor os nutrientes de *U. rigida* ao longo do tempo é a desidratação e a condição que conserva melhor os nutrientes de *G. sp.* ao longo do tempo é a salmoura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graham, L. E., Wilcox, L. W. & Graham, J. M. *Algae*. (Universidade da Califórnia, 2009).
2. Castro, Peter; Huber, M. E. *Biologia Marinha*. (McGraw Hill Brasil, 2012).
3. Jueterbock, A., Smolina, I., Coyer, J. A. & Hoarau, G. The fate of the Arctic seaweed *Fucus distichus* under climate change: An ecological niche modeling approach. *Ecol. Evol.* **6**, 1712–1724 (2016).
4. Tibbetts, S. M., Milley, J. E. & Lall, S. P. Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *J. Appl. Phycol.* 1–11 (2016).
5. El-Said, G. F. & El-Sikaily, A. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. *Environ. Monit. Assess.* **185**, 6089–6099 (2013).
6. Van Den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. *Algae: an introduction to phycology*. *Search* (Cambridge University Press, 1995). doi:10.2307/1468159
7. Zemke, W. L. & Ohno, M. World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.* **11**, 369–376 (1999).
8. Valente, L. M. P.; Araújo, M.; Batista, S.; Peixoto, M. J.; Sousa-Pinto, I.; Brotas, V.; Cunha, L. M.; Rema, P. Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva spp.* *J. Appl. Phycol.* **28**, 691–701 (2016).
9. Farasat, M. & Khavari-nejad, R. Antioxidant Activity , Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. **13**, 163–170 (2014).
10. Cardoso, S. M.; Carvalho, L. G.; Silva, P. J.; Rodrigues, M. S.; Pereira, O.R.; Pereira, L. *Bioproducts From Seaweeds: A Review With Special Focus On The Iberian Peninsula*. (2013).
11. Lordan, S., Ross, R. P. & Stanton, C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs* **9**, 1056–1100 (2011).
12. Shalaby, E. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1338–1350 (2011).

13. Cian, R. E., Drago, S. R., De Medina, F. S. & Martínez-Augustin, O. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota. *Mar. Drugs* **13**, 5358–5383 (2015).
14. Macartain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R. & Rowland, I. R. Nutritional Value of Edible Seaweeds. **65**, 535–543 (2007).
15. Holdt, S. L. & Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **23**, 543–597 (2011).
16. Fleurence, J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 25–28 (1999).
17. Burtin, P. Nutricional Value of Seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2**, 498–503 (2003).
18. Kadam, S. U., Tiwari, B. K. & O'Donnell, C. P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 4667–4675 (2013).
19. Sánchez-Machado, D. ., López-Hernández, J. & Paseiro-Losada, P. High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. *J. Chromatogr. A* **976**, 277–284 (2002).
20. Lahaye, M. & Robic, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* **8**, 1765–1774 (2007).
21. Raimundo, S.C.; Avci, U.; Hopper, C.; Pattathil, S.; Hahn, M. G.; Popper, Z. A. Immunolocalization of cell wall carbohydrate epitopes in seaweeds: presence of land plant epitopes in *Fucus vesiculosus* L. (*Phaeophyceae*). *Planta* **243**, 337–354 (2016).
22. Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H. M. *Algae*. (Cambridge University Press, 1995).
23. Kuniyoshi, M., Yamada, K. & Higa, T. A biologically active diphenyl ether from the green alga *Cladophora fascicularis*. *Experientia* **41**, 523–524 (1985).
24. Thanh, T. T. T.; Quach, T. M. T.; Nguyen, T. N.; Vu Luong, D.; Bui, M. . L. & Tran, T. T. V. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**, 695–702 (2016).
25. Chen, J. L., Gerwick, W. H., Schatzman, R. & Laney, M. Isorawsonol and Related IMP Dehydrogenase Inhibitors from the Tropical Green Alga *Avrainvillea rawsonii*. *J. Nat.*

- Prod.* **57**, 947–952 (1994).
26. Paul, V. J. & Fenical, W. Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda* (Chlorophyta). *Tetrahedron* **40**, 3053–3062 (1984).
 27. Fenical, W. & Sims, J. J. Cycloeudesmol, an antibiotic cyclopropane containing sesquiterpene from the marine alga, *Chondria oppositoclada dawson*. *Tetrahedron Lett.* **15**, 1137–1140 (1974).
 28. Ali, M. S., Saleem, M., Yamdagni, R. & Ali, M. A. Steroid and Antibacterial Steroidal Glycosides from Marine Green Alga *Codium Iyengarii* Borgesen. *Nat. Prod. Lett.* **16**, 407–413 (2002).
 29. Claudia Osterhage, Ronald Kaminsky, Gabriele M. König, and & Anthony D. Wright. Ascosalipyrrolidinone A, an Antimicrobial Alkaloid, from the Obligate Marine Fungus *Ascochyta salicorniae* (2000).
 30. Niel, D. N., Cross, S. S., Koehn, F. E. & Gunasekera, S. F. Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine alga *Halimeda tuna*. **32**, 169–172 (1991).
 31. Wall, M. E., Wani, M. C., Manikumar, G., Taylor, H., Hughes, T. J., Gaetano, K., Gerwick, W. H., McPhail, A. T., McPhail, D. R.. Structure and Antimutagenic Properties of Cymbobarbatol and 4-Isocymbobarbatol, New Cymopols from Green Alga (*Cymopolia barbata*). *J. Nat. Prod.* **52**, 1092–1099 (1989).
 32. Li, X. C., Jacob, M. R., Ding, Y., Agarwal, A. K., Smillie, T. J., Khan, S. I., Nagle, D. G., Ferreira, D., Clark, A. M. Capisterones A and B, which enhance fluconazole activity in *Saccharomyces cerevisiae*, from the marine green alga *Penicillus capitatus*. *J. Nat. Prod.* **69**, 542–6 (2006).
 33. Pereira, L.; Ribeiro Claro, P. J. a. in *Marine Algae - Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment and Biotechnology* 1–7 (Science Publishers, 2014).
 34. Pereira, L. in *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses* 15–47 (Nova Science Publishers, 2011).
 35. Taboada, C., Millán, R. & Míguez, I. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 445–449 (2010).
 36. Ak, İ., Öztaşkent, C., Özüdoğru, Y. & Göksan, T. Effect of sodium acetate and sodium nitrate on biochemical composition of green algae *Ulva rigida*. *Aquac. Int.* **23**, 1–11

(2014).

37. Altamirano, M., Flores-Moya, A. & Figueroa, F. L. Long-Term Effects of Natural Sunlight under Various Ultraviolet Radiation Conditions on Growth and Photosynthesis of Intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) Cultivated In Situ. *Offpr. Bot. Mar.* **43**, 119–126 (2000).
38. Costa, J. C., Gonçalves, P. R., Nobre, A. & Alves, M. M. Bioresource Technology Biomethanation potential of macroalgae *Ulva spp.* and *Gracilaria spp.* and in co-digestion with waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* **114**, 320–326 (2012).
39. Usov, A. I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocoll.* **6**, 9–23 (1992).
40. Lee, R. E. *Basic characteristics of the algae. Phycology* (Cambridge University Press, 2008).
41. Pereira, L. in *Handbook of Marine Biotechnology* **79**, 1125–1126 (Springer Berlin Heidelberg, 2015).
42. Suzuki, T., Suzuki, M., Furusaki, A., Matsumoto, T., Kato, A., Imanaka, Y., Kurosawa, E. Teurilene and thyriferyl 23-acetate, meso and remarkably cytotoxic compounds from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) lamouroux. *Tetrahedron Lett.* **26**, 1329–1332 (1985).
43. Higa, T. 2-(1-chloro-2-hydroxyethyl)-4,4-dimethylcyclohexa-z,s-dienone: A precursor of 4,5-dimethylbenzo[b]furan from the red alga *Desmia horlvemanni*. **26**, 2335–2336 (1985).
44. Fuller, R. W., Cardellina, J. H., Jurek, J., Scheuer, P. J., Alvarado-Lindner, B., McGuire, M., Gray, G. N., Steiner, J. R., Clardy, J. Isolation and Structure/Activity Features of Halomon-Related Antitumor Monoterpenes from the Red Alga *Portieria hornemannii*. *J. Med. Chem.* **37**, 4407–4411 (1994).
45. Ohta, K., Mizushima, Y., Hirata, N., Takemura, M., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S., Sakaguchi, K. Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a New Potent Inhibitor of Eukaryotic DNA Polymerases and HIV-Reverse Transcriptase Type 1 from a Marine Red Alga, *Gigartina tenella*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **46**, 684–686 (1998).
46. Han'guk Susan Kwahakhoe., P. H., Young, C. H., Jong, K. & Sue, C. J. Antioxidant

- Activity of 2,3,6-Tribromo-4,5-dihydroxy benzyl methyl ether from *Symphyocladia latiuscula*. *Fish. Aquat. Sci.* **2**, 1–7 (1999).
47. Lik T. T., Williamson R. T., Gerwick, W. H., Watts, K. S., McGough K., Jacobs, R. cis,cis- and trans,trans-Ceratospongamide, New Bioactive Cyclic Heptapeptides from the Indonesian Red Alga *Ceratodictyon spongiosum* and Symbiotic Sponge *Sigmatocia symbiotica*. (2000).
 48. Sims, J. J., Lin, G. H. Y. & Wing, R. M. Marine natural products X elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Lett.* **15**, 3487–3490 (1974).
 49. San-Martin, A., Negrete, R. & Roviroso, J. Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from chilean *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry* **30**, 2165–2169 (1991).
 50. Gulaçtı T., Zeynep A., Sedat I., Ahmet C. G., Pezzuto J. M., Clement J. A., Kingston D. G. I. Brominated Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*. (2003).
 51. Chaoyuan, Wu; Minghuo, Ji; Renzhi, Li; Xiaohang, Wang; Zenian, Liu Sijian Miao; Jimin, S. Training Manual on *Gracilaria* Culture and Seaweed Processing in China. *FAO Corporate Document Repository* (1990). Available at: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab730e/ab730e01.htm>. (Accessed: 6th July 2015)
 52. Chakraborty, S. & Bhattacharya, T. Nutrient composition of marine benthic algae found in the Gulf of Kutch coastline, Gujarat, India. **3**, 32–38 (2012).
 53. Cirik, S., Cetin, Z., Ak, I., Cirik, S. & Goksan, T. Greenhouse Cultivation of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and Determination of Chemical Composition. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* **10**, 559–564 (2010).
 54. Gustavsson, J., Cederberg, C. & Sonesson, U. *Global food losses and food waste*. (2011).
 55. Jenkins, W. A. & Harrington, J. P. *Packaging Food with Plastics*. (Technomic Publishing Company, Inc., 1991).
 56. Augustin, M. A.; Riley, M.; Stockmann, R.; Bennett, L.; Kahl, A.; Lockett, T.; Osmond, M.; Sanguansri, P.; Stonehouse, W.; Zajac, I.; Cobiac, L. Role of food processing in food and nutrition security. *Trends Food Sci. Technol.* **56**, 115–125 (2016).
 57. Jarvis, N. A.; O'Bryan, C. A.; Dawoud, T. M.; Park, S. H.; Kwon, Y. M.; Crandall, P.

- G.; Ricke, S. C. An overview of Salmonella thermal destruction during food processing and preparation. *Food Control* **68**, 280–290 (2016).
58. Fellows, P. J. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. (CRC Press, 2000).
 59. Gava, A. J. *Princípios da Tecnologia de Alimentos*. (NBL Editora, 2007).
 60. SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial). *Manipulador de Alimentos*. (SESI SENAI Editora, 2014).
 61. Gava, A. J., Silva, C. A. B. & Frias, J. R. G. *Tecnologia de Alimentos*. (NBL Editora, 2009).
 62. Claudio, L. Our Food: Packaging and Public Health. *Environmental Health Perspectives* **120**, 6 (2012).
 63. Kuswandi, B., Wicaksono, Y., Jayus, Abdullah, A., Heng, L. Y., Ahmad, M. Smart packaging: sensors for monitoring of food quality and safety. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* **5**, 137–146 (2011).
 64. Castilho, M. Manual de boas práticas de fabrico - Cartolina e Cartão Canelado. 1–138 (2012).
 65. Comissão Europeia. *Regulamento (UE) N.º 10/2011 da Comissão de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos*. 89 (2011).
 66. Tudo sobre plásticos. (2016). Available at: <http://www.tudosobreplasticos.com/>. (Accessed: 29th November 2016)
 67. Cedrón, J. C., Landa, V. & Robles; Juana. Química General. Material de enseñanza. (2009).
 68. Robertson, G. L. *Food Packaging: Principles and Practice*. (CRC Press, 2016).
 69. Guangzhou PKQ Packaging Supplier Co., L. Tamanho 11*16 cm embalagem de Alimentos saco de papel kraft sacos de papel Kraft com janela redonda de pé zip lock bolsa. *Alibaba* (2017). Available at: <https://portuguese.alibaba.com/p-detail/size-11-16cm-food-paper-stand-up-packaging-bags-kraft-with-round-window-zipper-zip-lock-60505968897.html>. (Accessed: 19th January 2017)
 70. Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia. *Regulamento (CE) N.º 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro de 2004, relativo aos materiais*

e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. 14 (Parlamento Europeu, 2004).

71. Comissão das Comunidades Europeias. *Regulamento (CE) N.º 2023/2006 da Comissão de 22 de Dezembro de 2006 relativo às boas práticas de fabrico de materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos. 4 (Comunidade Europeia, 2016).*
72. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. *Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011. J. Of. da União Eur. 2011, 18–63 (2011).*
73. Centro Nacional de Embalagem. Materiais em Contacto Alimentar. Available at: <http://cne.isq.pt/Home.aspx>. (Accessed: 30th November 2016)
74. Comissão Europeia. Regulamento (CE) N.º 1935/2004. *J. Of. da União Eur. 4–17 (2004).*
75. União Europeia. Regulamento (CE) N.º 2023/2006 da Comissão, de 22 de Dezembro de 2006, relativo às boas práticas de fabrico de materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos. *J. Of. da União Eur. 2006–2009 (2006).*
76. Green, L. A. & Neefus, C. D. The effects of short- and long-term freezing on *Porphyra umbilicalis* Kützinger (*Bangiales, Rhodophyta*) blade viability. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **461**, 499–503 (2014).
77. Ragaert, P., Devlieghere, F. & Debevere, J. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **44**, 185–194 (2007).
78. AlgaPlus. Alga+. (2016). Available at: <http://www.algaplus.pt/>. (Accessed: 21st November 2016)
79. Tello-Ireland, C., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, J. & Di Scala, K. Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT - Food Sci. Technol.* **44**, 2112–2118 (2011).
80. Shanghai Kingland Fine Chemistry Co., L. Shanghai Kingland Fine Chemistry Co., Ltd. *The color difference, control technology 1* (2012). Available at: http://www.kingland-sh.com/en/technology_43.html. (Accessed: 16th October 2017)
81. Fontes, L. C. B., Sarmiento, S. B. S., Spoto, M. H. F. & Dias, C. T. dos S. Conservação

de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **28**, 872–880 (2008).

82. Harder, M. N. C., Canniatti-Brazaca, S. G. & Arthur, V. Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com *Urucum* (*Bixa orellana*). *Rpcv* **102**, 339–342 (2007).
83. Vega-Mercado, H. *Dehydration of Foods*. (Springer Science & Business Media, 2013).
84. Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350–382 (1987).
85. Yadav, A. K. & Singh, S. V. Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1654–1673 (2012).
86. Briggs, D. The Dimensions of Colour. *Modern colour theory for traditional and digital painting media 7* (2017). Available at: <http://www.huevaluechroma.com/index.php>. (Accessed: 20th November 2017)
87. Priecina, L. & Karklina, D. Natural Antioxidant Changes in Fresh and Dried Spices and Vegetables. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnological Eng.* **8**, 498–502 (2014).
88. Kato, K., Hayashi, M., Umene, S. & Masunaga, H. A novel method for producing softened edible seaweed kombu. *LWT - Food Sci. Technol.* **65**, 618–623 (2016).
89. Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. & Baker, R. A. Use of Edible Coatings to Preserve Quality of Lightly (and Slightly) Processed Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 509–524 (1995).
90. Prinzivalli, C., Brambilla, A., Maffi, D., Lo, R. & Danila, S. Effect of osmosis time on structure , texture and pectic composition of strawberry tissue. 119–127 (2006). doi:10.1007/s00217-006-0298-9
91. Hung, Y. C. & Thompson, D. R. Changes in Texture of Green Peas during Freezing and Frozen Storage. *J. Food Sci.* **54**, 96–101 (1989).
92. Cabrita, A. R. J., Maia, M. R. G., Sousa-Pinto, I. & Fonseca, A. J. M. Ensilage of seaweeds from an integrated multi-trophic aquaculture system. *Algal Res.* **24**, 290–298 (2017).
93. McCauley, J. I., Meyer, B. J., Winberg, P. C. & Skropeta, D. Parameters affecting the analytical profile of fatty acids in the macroalgal genus *Ulva*. *Food Chem.* **209**, 332–340

(2016).

94. Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **56**, 365–79 (2002).
95. Dere, Ş., Dalkiran, N., Karacaoğlu, D., Yildiz, G. & Dere, E. The determination of total protein, total soluble carbohydrate and pigment contents of some macroalgae collected from Gemlik-Karacaali (Bursa) and Erdek-Ormanli (Balıkesir) in the Sea of Marmara, Turkey. *Oceanologia* **45**, 453–471 (2003).
96. Ortiz, J; Romero, N; Robert, P; Araya, J; Lopez-Hernandez, J; Bozzo, C; Navarrete, E; Osorio, A; Rios, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem.* **99**, 98–104 (2005).
97. Pérez, M. J., Falqué, E. & Domínguez, H. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs* **14**, 1–38 (2016).
98. Xia, J., Li, Y. & Zou, D. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. *Aquat. Bot.* **80**, 129–137 (2004).
99. James, I. F. & Kuipers, B. *Preservation of fruit and vegetables*. (2003).
100. Pereira, L. MACOI - Portal Português das Macroalgas. (2015). Available at: <http://macoi.ci.uc.pt/>. (Accessed: 16th November 2016)
101. Guiry, Mike; Guiry, Wendy; Miranda, Salvador Valenzuela; Langangen, Anders; Garbary, D. AlgaeBase. Available at: <http://www.algaebase.org/>. (Accessed: 16th November 2016)
102. Isca, V.M.S., Seca, A.M.L., Pinto, D.C.G.A., Silva, H., Silva, A.M.S. Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry* **165**, 330–336 (2014).

7. ANEXOS

7.1. Anexo I

Data	Armazém de produto acabado, desidratado		
	Hora	Temperatura (°C)	Humidade Relativa (%)
<i>Outubro</i>			
28	9.15	26,2	74
29	10.30	22,6	61
31	11.27	22,2	54
<i>Novembro</i>			
2	11.11	22,4	55
3	10.51	22,3	55
4	8.30	21,5	54
7	12.57	16,8	62
21	10.00	18,8	54
22	11.40	17,2	53
23	10.00	15,1	54
25	11.32	15,3	54
<i>Dezembro</i>			
5	12.30	18,2	51
12	10.55	16,1	54
20	8.50	13,1	52
23	9.30	13,4	53
28	10.01	13,4	53
29	11.35	14,2	54
30	10.51	13,9	54

<i>Janeiro</i>			
4	12.10	16,6	51
5	14.10	16,4	52
6	16.09	16,8	53
9	12.50	12,9	52
10	12.23	14,3	51
12	15.14	15,2	54
16	9.10	12,2	51
17	17.50	14,7	52
18	14.30	13,9	51
19	14.40	13,2	48
20	9.40	11,3	50
26	10.40	13,8	52
31	9.31	14,8	52
<i>Fevereiro</i>			
1	10.00	15,1	53
6	14.15	16,0	53
7	12.15	16,9	53
8	12.50	15,3	53
10	9.39	15,1	53
13	14.15	15,7	55
14	10.10	15,5	56
15	7.30	15,3	51
17	14.00	17,0	51
20	9.38	15,9	50
23	10.00	17,0	50

24	12.00	16,8	52
26	12.00	17,2	59
27	12.38	17,5	52